Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Stabilität Sphingomyelin-haltiger Liposomenmembranen gegenüber den physiologischen Trihydroxy-Gallensäuren bei verschiedenen Inkubationstemperaturen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Peter Troschel
aus Kronach

1986

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Stabilität Sphingomyelin-haltiger Liposomenmembranen gegenüber den physiologischen Trihydroxy-Gallensäuren bei verschiedenen Inkubationstemperaturen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Peter Troschel
aus Kronach

1986

Dekan:	Professor Dr. J. Dichgans
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. K. H. Schmidt
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. D. Luft

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. L. Koslowski danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Recht herzlich danke ich Prof. Dr. Dr. K.H. Schmidt für die Überlassung des Themas und die rasche Durchsicht meiner Arbeit.

Herrn Dr. Rolf Schubert danke ich für die Präparation der Liposomen-Suspensionen und die Hilfe bei der Einarbeitung in die Methodik. Mir bleibt nur ein herzliches Dankeschön für Deine ständige Bereitschaft zum Gespräch, die vielen Anregungen und den gelassenen Optimismus, den Du auch weiterzugeben verstehst.

Ihm und Herrn Dr. K. Beyer danke ich für die Anfertigung der ^{31}P-NMR-Analysen.

Herrn PD Dr. H. Wolburg danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Herrn M. Blaurock danke ich für die Aufarbeitung der verschiedenen Phospholipid-Präparate für die Gaschromatographie, Herrn S. Fischer für die Durchführung der gaschromatographischen Analysen.

Enfin je ne veux pas oublier d'exprimer mes remerciements sincères à tous les autres, qui m'ont aidé pendant ces mois de travail.

Für meine Freunde

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Sphingmyelin in Membransystemen	1
1.1.1.	Vorkommen	2
1.1.2.	Struktur	2
1.1.2.1.	Chemischer Aufbau	2
1.1.2.2.	Funktioneller Aufbau	3
1.1.2.2.1.	Hydrophober Bereich	3
1.1.2.2.2.	Zwischenbereich	3
1.1.2.2.3.	Hydrophiler Bereich	5
1.1.3.	Molekülkonformation	5
1.1.4.	Phasenübergangsverhalten	5
1.1.5.	Phasenseparationen	8
1.1.6.	Monolayer-coupling	10
1.1.7.	Physikalische Membraneigenschaften	11
1.1.7.1.	Mechanische Stabilität	11
1.1.7.2.	Permeabilität	11
1.2.	Sphingomyelin und Gallensäureresistenz	12
1.2.1.	Der relativ hohe SM-Anteil an den Membranphospholipiden der Gallenkanalmembran	12
1.2.2.	Die höhere Gallensäure-Resistenz von Membranen mit höherem SM-Gehalt	13
1.2.3.	Der geringe Anteil von SM an den Phospholipiden, die durch Gallensäure-Einwirkung aus Membranen freigesetzt werden	16
1.3.	Aufgabenstellung dieser Arbeit	18
1.4.	Bisherige Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von Gallensäuren mit Membranen - Liposomen als Modell-Membranen	18
2.	Materialien und Methoden	22
2.1.	Materialien	22
2.1.1.	Chemikalien	22
2.1.2.	Geräte	22

Seite

2.2. Methoden ... 23
2.2.1. Liposomenpräparation und Säulenläufe ... 23
2.2.2. Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen ... 25
2.2.3. Größenbestimmung der Liposomen ... 26
2.2.4. Inkubationsversuche mit Gallensäuren ... 26

3. Ergebnisse ... 28

3.1. Charakterisierung der verwendeten Liposomen ... 28
3.1.1. Gegenüberstellung der verschiedenen Sphingomyelin-Präparate ... 28
3.1.1.1. Chemische Zusammensetzung ... 28
3.1.1.2. Auswahl des zu verwendenden Präparats ... 29
3.1.2. Temperaturabhängigkeit der Membraneigenschaften ... 31
3.1.2.1. Temperaturabhängigkeit der Liposomenpräparation ... 31
3.1.2.2. Temperaturabhängigkeit der Membranordnung ... 35
3.1.3. Größenbestimmung der Liposomen ... 40
3.1.4. Elektronenmikroskopie ... 41
3.1.5. ^{31}P-NMR-Analyse ... 45
3.2. Bestimmung der Gallensäure-Resistenz der Liposomen ... 46
3.2.1. Verdünnungsreihen ... 46
3.2.2. Verhältnis von Sphingomyelin und Lecithin bei der Emulgierung ... 48
3.2.3. Gallensäure-Resistenz der Liposomenmembranen in Abhängigkeit von ihrem Sphingomyelin-Gehalt und der Inkubationstemperatur ... 50
3.2.3.1. Abhängigkeit der Gallensäure-Resistenz vom Sphingomyelin-Gehalt ... 59
3.2.3.2. Abhängigkeit der Gallensäure-Resistenz von der Inkubationstemperatur ... 62

4. Diskussion

4.1. Probleme bei der Liposomenpräparation ... 65
4.1.1. Probleme bei der Präparation unterhalb der Übergangstemperatur ... 65

Seite

4.1.2. Probleme bei der Präparation von Liposomen mit sehr hohem ESM-Gehalt..... 65
4.2. Eigenschaften der Liposomen..... 66
4.3. Sphingomyelin und Gallensäure-Resistenz..... 68
4.4. Membranordnung und Gallensäure-Resistenz..... 70
4.5. Temperaturabhängigkeit der Gallensäure-Resistenz..... 70

5. Zusammenfassung..... 74

6. Bildanhang..... 75

7. Literaturverzeichnis..... 93

Abkürzungsverzeichnis

BCM	Bile Canalicular Membrane, Gallenkapillarmembran
C	Natrium-Cholat
CMC	Kritische Micellare Konzentration
CMT	Kritische Micellare Temperatur
ESM	Eidotter-Sphingomyelin
0-85ESM	Präparationen, die zu 0 - 85% aus Eidotter-Sphingomyelin und entsprechend zu 100 - 15% aus Eidotter-Lecithin bestehen.
GC	Natrium-Glykocholat
LPM	Laterale Plasma-Membran
PC	Phosphatidylcholin, Lecithin
RHSM	Rinderhirn-Sphingomyelin
SESM	Schweineerythrozyten-Sphingomyelin
SIM	Sinusoidale Membran
SM	Sphingomyelin
TC	Natrium-Taurocholat

1. Einleitung

Eine bisher trotz intensiver Forschung noch nicht zu beantwortende Frage ist, warum Hepatozyten hohen Konzentrationen von Gallensäuren im Canaliculus widerstehen können, ohne lysiert zu werden. Eine Reihe von experimentell untermauerten Überlegungen wurden dazu angestellt. Folgende Schutzmechanismen werden diskutiert:

- eine besondere Zusammensetzung der Galle
- besondere Exkretionsmechanismen für die Gallensäuren
- besondere Reparaturmechanismen der Gallenkanalmembran (Bile Canalicular Membrane = BCM)
- eine besondere Konformation der BCM
- eine besondere chemische Zusammensetzung der BCM, z.B.
  - eine besondere Protein- / Glykoprotein-Struktur
  - ein bestimmtes Lipidmuster der BCM

Vor allem letzterer Mechanismus fand besondere Aufmerksamkeit. Es wurde wiederholt erörtert, daß v.a. Sphingomyelin (SM) ein wichtiger die Gallensäure-Resistenz erhöhender Faktor sein dürfte. Argumente für diese These sind:

- Das physikochemische Verhalten von SM in Membransystemen: SM hat die Membran ordnende Eigenschaften, erhöht ihre Rigidität und vermindert die Membranpermeabilität für kleine Moleküle.
- Das Vorkommen von SM und sein Verhalten in einem Gallensäure-Angriff ausgesetzten Membranen:
  - Der relativ hohe SM-Anteil an den Membranlipiden der BCM
  - Die höhere Gallensäure-Resistenz von Membranen mit höherem SM-Anteil
  - Der geringe Anteil von SM an den Phospholipiden, die bei einem Gallensäure-Angriff aus Membranen freigesetzt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse widersprechen bisherigen Überlegungen, die im folgenden im einzelnen dargestellt und mit den Resultaten dieser Studie diskutiert werden.

1.1. Sphingomyelin in Membransystemen

Als wichtiges Phospholipid und Membran-Baustein fand SM erst im letzten Jahrzehnt größere Aufmerksamkeit. Es liegen mittlerweile eine Reihe von experimentellen Ergebnissen vor, die eine grobe Gegenüberstellung von SM und Lecithin (Phosphatidylcholin = PC), dem sicherlich wichtigsten und am besten bekannten Membranlipid, ermöglichen (2).

1.1.1. Vorkommen

Lecithine und Sphingomyeline machen zusammen etwa die Hälfte der Phospholipide von Säugetier-Zellmembranen aus; dieser Anteil verändert sich nicht, wenn auch das SM : Lecithin - Verhältnis in weiten Bereichen schwanken kann. Bei verschiedenen Krankheiten wie der Arteriosklerose oder dem Atemnotsyndrom der Neugeborenen zeigen sich deutliche Verschiebungen dieses Quotienten. Dagegen zeigt der SM-Gehalt von natürlich vorkommenden Membranen meist eine positive Korrelation zum Cholesterol-Gehalt; auch bei der schwerwiegenden Abbaustörung des SM - der Niemann-Pick'schen Erkrankung - läßt sich eine Erhöhung des Membran-Cholesterols feststellen (2).

In natürlich vorkommenden Membranen findet sich der weitaus größte Anteil des SM meist in dem äußeren Layer. Dies wurde v.a. für Erythrozyten von Ratte (47) und Mensch (66) mehrfach nachgewiesen, bei denen der SM-Anteil im "outer layer" vermehrt lange Seitenketten aufweist (5). Auch in kleinen unilamellaren Vesikeln aus SM-PC-Gemischen zeigt SM eine - wenn auch nur schwache - Tendenz, sich in dem äußeren Layer stärker anzureichern (11 , 50) im Gegensatz zum Lecithin, dessen ^{31}P-NMR-Signal sich durch ein nur auf den "outer layer" wirkendes "shift reagent" nicht im gleichen Maß verschieben läßt.

1.1.2. Struktur

1.1.2.1. Chemischer Aufbau (s. Abb. 1)

PC besteht aus zwei langen Acyl-Ketten, die mit einem Glycerin-Molekül in Position 2 bzw. 3 verestert sind, das seinerseits wieder über seine 3. Hydroxylgruppe an Phosphorylcholin gebunden ist.

Beim SM übernimmt eine lange Kohlenwasserstoff-Kette, 1,3-dihydroxy-2-amino-4-octadecen - kurz Sphingosin genannt - die Position, die beim PC die in Position 3 des Glycerins gebundene Acyl-Kette und das Glycerin einnehmen. In den meisten biologischen Präparaten findet sich neben Sphingosin in einem geringen Prozentsatz auch 1,3-dihydroxy-2-amino-octadecan, kurz Dihydro-Sphingosin, bei dem die 4-5-trans-Doppelbindung fehlt; in geringen Mengen kommen auch Sphingosin-Basen mit anderen Kettenlängen vor. Über die Aminogruppe in C-2-Position des Sphingosins ist eine weitere Acyl-Kette gebunden. Über die Hydroxy-Gruppe in C-1-Position ist Phosphorylcholin gebunden (2).

1.1.2.2. Funktioneller Aufbau (s. Abb. 1)

SM ist wie PC ein amphipathisches Molekül, d.h. es enthält einen polaren, hydrophilen Bereich - das Phosphorylcholin - und einen nichtpolaren, hydrophoben Bereich - die beiden Kohlenwasserstoff-Ketten. Beide Substanzen richten in Wasser in großer Zahl in einer Ebene nebeneinander liegend ihre hydrophoben Bereiche so aus, daß eine weitere Schicht von Molekülen, die ihre hydrophoben Bereiche der hydrophoben Seite der ersten Schicht anliegen läßt, diesem Gebilde an seiner Oberfläche rundum hydrophile Eigenschaften gibt. Kurz, sie bilden in Wasser spontan Lipiddoppelschichten (Bilayers). PC und SM bestehen also dem Prinzip nach aus gleichen funktionellen Einheiten:

1. dem hydrophoben Bereich, den zwei langen unverzweigten Kohlenwasserstoff-Ketten,
2. einem verbindendem Zwischenbereich mittlerer Polarität und
3. dem hydrophilen Bereich, bei beiden Molekülen dem Phosphorylcholin.

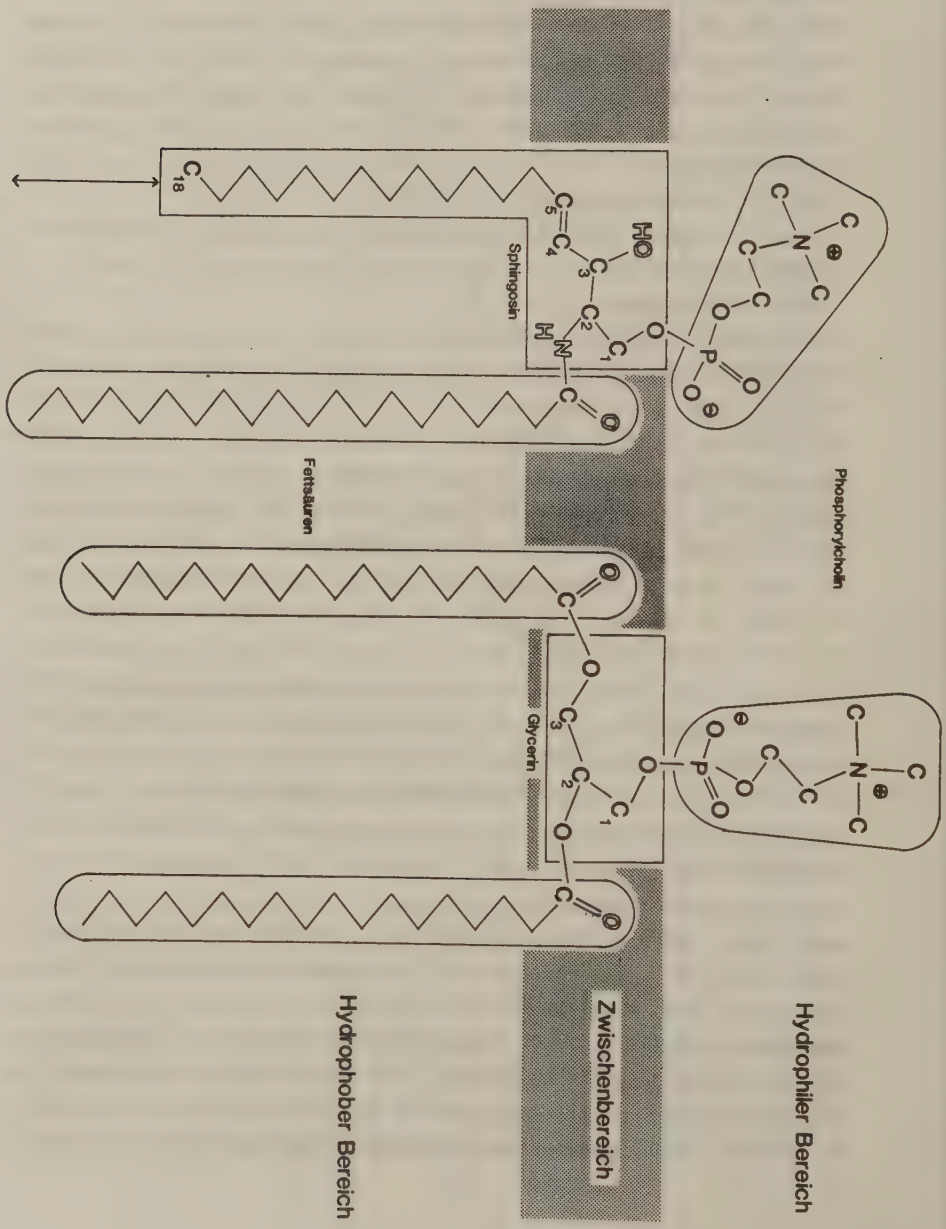
1.1.2.2.1. Hydrophober Bereich

Beim SM, das ja nur eine variable Seitenkette besitzt, finden sich mit abnehmender Häufigkeit Acyl-Seitenkettenlängen von 16, 24, 22 und 18 C-Atomen. Da die Länge der Sphingosin-Kette fix ist und diese Kette 13-15 C-Atome dem hydrophoben Bereich beisteuert, ergibt sich für das SM eine Seitenketten-Längendifferenz. Mit über 50% Acyl-Ketten, die aus über 20 C-Atomen bestehen, beträgt die Seitenketten-Längendifferenz in über 50% mehr als 5-7 C-Atome. Für das PC dagegen zeigte sich, daß die beiden Acyl-Ketten eines Moleküls sich kaum in ihrer Länge unterscheiden. Auch im Sättigungsgrad unterscheiden sich die Acyl-Ketten von SM und PC deutlich: SM besitzt durchschnittlich 0,1-0,35 cis-Doppelbindungen pro Molekül, PC dagegen 1,1-1,5 (Beim PC ist die Acyl-Kette in C-3-Position meist gesättigt, die in C-2-Position meist ungesättigt.) (2).

1.1.2.2.2. Zwischenbereich

Auch dieser Molekülanteil unterscheidet sich wesentlich beim SM und beim PC: PC enthält lediglich 2 Carbonyl-Gruppen, potentielle Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen; SM dagegen besitzt 2 potentielle Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen, die Hydroxy-Gruppe und die amidische Bindung, und zusätzlich noch eine Carbonyl-Gruppe. Diese Region ist zwar direkten Untersuchungen kaum zugänglich, es ergaben sich jedoch eine Reihe von Hinweisen darauf, daß Wasser-

Abbildung 1 : Schematische Darstellung der Molekularstruktur von Sphingomyelin und Lecithin.



stoffbrückenbindungen wirksam werden (50 , 62).

1.1.2.2.3. Hydrophiler Bereich

Dieser Anteil ist zwar beim SM wie beim PC Phosphorylcholin; die Bewegungsfreiheit dieser Gruppe ist aber beim SM im Vergleich zum PC etwas eingeschränkt, wie sich aus ^{31}P-NMR-Studien ergibt. Verantwortlich dafür gemacht werden die oben beschriebenen intra- (und inter-) molekularen Wasserstoffbrückenbindungen. Diese polaren Gruppen scheinen beim SM anders als beim PC - wohl eben durch die Wasserstoffbrückenbindungen - aus der Achse senkrecht zum Bilayer ausgelenkt zu sein (30 , 50).

1.1.3. Molekülkonformation

Mittels Röntgenstrukturanalysen kann man sich ein grobes Bild von der Konformation der Moleküle machen, die den Bilayer aufbauen. Ungesättigte Acylseitenketten führen zu einer Vergrößerung der von einem SM-Molekül eingenommenen Oberfläche (45). Temperaturerhöhungen auf Werte oberhalb der Übergangsstemperatur bewirken bei SM-Membranen eine Verschmälerung der Lipidschichtdicke des Bilayers, wohl weil die Acyl-Ketten aus der geordneten Längsausrichtung ausscheren, und damit eine Vergrößerung der Oberfläche, die ein Molekül im Bilayer beansprucht (9 , 46 , 56 , 64) (s. Tab. 1).

Dieses Phänomen ist auch bei Temperaturerhöhungen von reinen Lecithin-Membranen festzustellen. Die am meisten miteinander verglichenen Gemische sind Rinderhirn-SM (RHSM) und Ei-Lecithin; bei 25°C bildet RHSM einen breiteren Bilayer bei geringerer Oberfläche pro einzelnem Molekül als Ei-Lecithin, das bei 25°C weit oberhalb seiner Übergangstemperatur vorliegt (s. Tab. 2).

1.1.4. Phasenübergangsverhalten

Entscheidend für die Membranfunktion ist, in welchem Phasenzustand (grosso modo: als Gel oder als Flüssigkristall) diese Membran in biologischen Systemen vorliegt. Für künstliche Bilayers, die allein aus Sphingomyelin bestehen, ist bekannt, daß die Temperaturbereiche ihres jeweiligen Phasenübergangs im Bereich der Körpertemperatur von Warmblütern liegen.

Für Sphingomyeline mit definierten einheitlichen Acyl-Seitenketten liegen mittlerweile einige Daten vor. Palmitoyl-SM (16:0) hat seinen

Tabelle 1 : Röntgenstrukturdaten von multilamellaren SM-Bilayers bei verschiedenen Temperaturen

untersuchtes SM	Temperatur (°C)	lamellar repeat distance (Å)	lipid thickness (Å)	surface area ($Å^2$)	Quelle
Palmitoyl-SM	10	66,8	38,4	54,8	(9)
	50	61,6	35,4	59,4	(9)
RHSM	25	76	42,5	53,6	(56)
	47	60,2	38	60	(56)

Tabelle 2 : Röntgenstrukturdaten von multilamellaren RHSM- und Eidotter-Lecithin-Bilayers bei 25°C

untersuchtes Phospholipid	lamellar repeat distance (Å)	lipid thickness (Å)	surface area ($Å^2$)	Quelle
RHSM	76	42,5	53,6	(56)
Eidotter-Lecithin	63	38	68	(46)

Phasenübergang bei:

29 - 46°C	gemessen mit DPH-Fluoreszenz-Anisotropie	(34)
41°C	Calorimetrie	(41)
41,5°C	Calorimetrie	(9)
41,3	Calorimetrie	(1)

Wie beim PC erniedrigen Doppelbindungen die Übergangstemperatur deutlich:

Lignoceryl-SM (24:0)	42,6 + 48,6°C	Calorimetrie	(1)
Nervonyl-SM (24:1)	25 - 30°C	?	(10)

Die Hydrierung der trans-Doppelbindung zwischen C4 und C5 des Sphingosin dagegen hat nur eine geringe Auswirkung suf die Über-

gangstemperatur - ein weiterer Hinweis dafür, daß diese Doppelbindung eher dem Zwischenbereich des Moleküls zuzurechnen ist (1).
Ein deutlicher Unterschied zum Verhalten von PC ist, daß zwischen Acyl-Seitenkettenlänge einerseits und Übergangstemperaturen andererseits kein quasi-linearer Zusammenhang besteht:

Palmitoyl-SM (16:0)	41,3°C	Calorimetrie	(1)
Stearoyl-SM (18:0)	52,8°C	Calorimetrie	(1)
Lignoceryl-SM (24:0)	42,6 + 48,6°C	Calorimetrie	(1)

Stearoyl-SM nimmt also eine Sonderstellung ein, die durch einen energetisch besonders günstigen Ordnungszustand bei einer Seitenketten-Längendifferenz von 3 - 5 C-Atomen erklärt wird. Eine weitere Besonderheit des Stearoyl-SM ist, daß bei genauer Untersuchung aus diesem SM hergestellte multilamellare Liposomen-Membranen eine terperaturabhängige Langzeit-Hysterese zeigen (19). Membranen, die sehr lange unterhalb der Übergangstemperatur aufbewahrt wurden, zeigen einen Phasenübergang mit sehr hohen Enthalpien bei 57°C; Membranen, die einige Zeit vor der Untersuchung auch nur kurzfristig über die Übergangstemperatur hinaus erwärmt waren, zeigen einen Phasenübergang bei 43 - 47°C mit geringer Enthalpie. Diese Membranen zeigen also, wenn sie lange tiefen Temperaturen ausgesetzt waren, ein "supercooling" in einen höchst-geordneten Zustand.
Mischungen aus Sphingomyelinen mit verschieden langen Seitenketten zeigen Übergangstemperaturen, die unterhalb der Übergangstemperaturen der einzelnen Komponenten liegen:

Palmitoyl-SM : Stearoyl-SM : Lignoceryl-SM = 1 : 1 : 1	39,5°C	Calorimetrie	(1)

Dies zeigt sich auch bei der Untersuchung natürlich vorkommender SM-Gemische, die jeweils ab Temperaturen von 31°C bis 52°C vollständig in flüssig-kristallinem Zustand vorliegen (1 , 10 , 17 , 43 , 50 , 55 , 56 , 64). (Eidotter-Lecithin hat seinen Phasenübergang bei -5°C.) Seitenkettenanalysen zeigen, daß die Übergangstemperatur weniger von der durchschnittlichen Seitenkettenlänge und dem Sättigungsgrad, sondern eher vom Gehalt an Palmitoyl-SM abhängen. Hohe Gehalte an überlangen Seitenketten und somit das gleichzeitige Vorliegen von Sphingomyelinen mit stark differierenden Seitenkettenlängen scheinen eine Störung in der Membranordnung zu verursachen, die niedrigere Übergangstemperaturen zur Folge hat.

Auch für Mischungen von Sphingomyelinen und Lecithinen liegen Daten vor (1 , 9 , 34 , 64). Es zeigt sich, daß deren Übergangstemperaturen zwischen denen der synthetischen PCs mit definierten Acylketten und relativ hohen Übergangstemperaturen und denen der verwendeten SM-Gemische liegen und mit steigendem SM-Gehalt zunehmen. Nur in einer Studie wurde ein natürlich vorkommendes Lecithin-Gemisch mit einer sehr niedrigen Übergangstemperatur und ein SM-Gemisch mit einer Übergangstemperatur von 38°C verwendet. Ab 20% SM-Gehalt zeigt sich ein Übergang um 20°C; bei höherem SM-Gehalt kommt noch ein zweiter höherer Übergang hinzu, der mit steigendem SM-Gehalt weiter ansteigt. Auch natürlich vorkommende Membranen mit extrem hohem SM-Gehalt weisen eine sehr hohe Übergangstemperatur auf:

Schafserythrozytenmembran 26 - 35°C
DPH-Fluoreszenz-Anisotropie (6)

Wird das Lecithin : SM - Verhältnis (0,03) erhöht (0,14), so nimmt die Membranfluidität zu (7).

1.1.5. Phasenseparationen

Experimentell gut belegt ist heute die Existenz von Phasenseparationen (48 , 60), d.h. die Tatsache, daß Membranen, die aus bestimmten Phospholipid-Gemischen bestehen, sich unter bestimmten Voraussetzungen entmischen. Dies ist v.a. dann festzustellen, wenn eines der Phospholipide unterhalb der Übergangstemperatur als Gel vorliegt; aber auch für Mischungen bestimmter im flüssig-kristallinen Zustand vorliegender Phospholipide sind Domänen-Bildungen beschrieben (70). Diese Phasenseparationen können elektronenmikroskopisch z.B. als Wellungen der Membran gesehen werden.

Mehrfach wurden Mehrgipfligkeiten von kalorimetrisch gewonnenen Kurven oder integrierten fluoreszenzanisotropisch gewonnenen "Mikroviskositäts"-Diagrammen als Hinweis auf ein gleichzeitiges Vorliegen verschiedenartiger Membranabschnitte, d.h. auf Phasenseparationen gewertet. Ob diese Phänomene aber tatsächlich auf Phasenseparationen, auf die indirekt gefolgert wurde, zurückzuführen sind ist fraglich. So wandeln sich z.B. aus Di-Palmitoyl-PC hergestellte kleine beschallte Liposomen bei bestimmten Temperaturen in große multilamellare Liposomen um, die eine etwas höhere Übergangstemperatur aufweisen (61). Auch zeigt Stearoyl-SM, wie oben beschrieben, je nach vorherigem

Ordnungszustand Phasenübergänge bei zwei verschiedenen Temperaturen (19). Klarere Ergebnisse geben Röntgenstrukturanalysen (9 , 64).

1. Reine SM-Membranen, die aus einer einzigen SM-Spezies mit definierter Seitenkette hergestellt wurden, zeigen i.a. einen nur eingipfligen Phasenübergang; die Zweigipfligkeit der kalorimetrischen Kurven von aus Lignoceryl-SM hergestellten multilamellaren Liposomen ist nicht erklärt (1 , 34). Innerhalb des Phasenübergangs liegen Domänen in Gel- und flüssig-kristallinem Zustand vor (34 , 43). Im Bereich und unterhalb der Übergangstemperatur zeigen sich komplexe elektronenmikroskopische Musterungen der Membran. Mischungen verschiedener Sphingomyeline haben ein- oder mehrgipflige Phasenübergänge (1 , 10).

2. Gemische aus Sphingomyelinen und Lecithinen zeigen je nach Bestandteilen und Mischungsverhältnissen schwer interpretierbare Ein- oder Mehrgipfligkeiten im Phasenübergang (1 , 9 , 34 , 64). Lentz et. al. (34) zogen aus Versuchen mit Dimyristoyl-PC (DMPC) und Palmitoyl-SM den Schluß, daß diese beiden Phospholipide sich frei mischen, sofern nicht beide unterhalb ihrer Übergangstemperaturen vorliegen. Calhoun und Shipley (9) untersuchten ebenfalls Mischungen aus Palmitoyl-SM und DMPC und fanden keinen Hinweis auf Phasenseparationen. Untracht und Shipley (64) unterzogen diese Phänomene an RHSM- und Ei-Lecithin-Gemischen einer profunden Untersuchung, die bei maximaler Hydratation folgendes Bild des Phasenverhaltens nahelegt (s. Abb. 2):

A) Oberhalb der Überganstemperatur beider Phospholipide sind diese völlig mischbar.

B) Unterhalb eines oberen Phasenübergangs bei über 33%-SM-Anteil liegen zwei Phasen vor: eine Gelphase von SM und eine flüssig-kristalline Phase von Lecithin mit Beimischungen von SM.

C) Unterhalb des zweiten, unteren Gipfels des Phasenübergans bei einem SM-Gehalt von über 33% koexistieren eine SM-Gel-Phase und eine intermediäre Phase, deren Röntgenstruktur-Daten zwischen denen von reinen SM-Membranen und denen von reinen Lecithin-Membranen liegen. Diese Intermediärphase soll 33 mol% SM enthalten.

D) Diese Intermediärphase ist auch bei niedrigeren SM-Gehalten unterhalb der Übergangstemperatur festzustellen; sie koexistiert hier aber mit einer flüssig-kristallinen Phase aus einem SM-Lecithin-Gemisch.

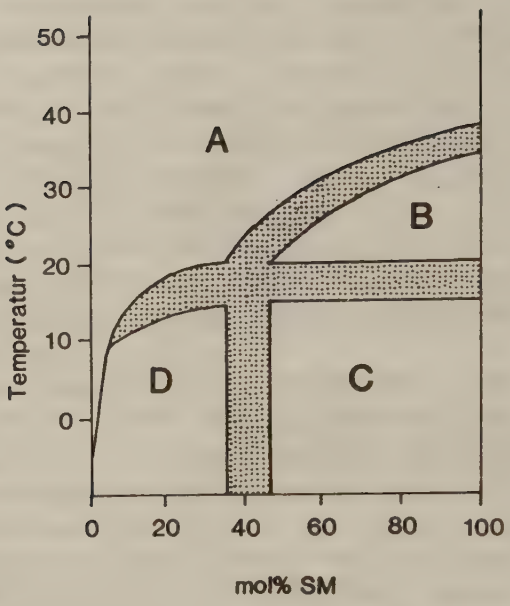


Abbildung 2 : Phasenverhalten von Lecithin-SM-Gemischen; Abbildung nach (64). Erläuterungen im Text.

1.1.6. Monolayer-coupling

Die Asymmetrie im Bau des SM-Moleküls, die besonders stark bei überlangen Seitenketten ausgeprägt ist, legt nahe, daß über eine Verzahnung der SM-Moleküle in einem Bilayer sich die beiden Layer wechselseitig in ihrer Bewegungsfreiheit einschränken. Merajver und Sheridan (37) zogen aus dem verschiedenen Phasenübergangsverhalten von Lignoceryl- und Palmitoyl-SM mithilfe eines eingehenden theoretischen Models den Schluß, daß bei Lignoceryl-SM im Gegensatz zu Palmitoyl-SM unterhalb wie oberhalb der Übergangstemperatur Interdigitationen vorliegen müßten. Bisher liegt nur eine experimentelle Studie (49) vor, die über eine Verschiebung der Übergangstemperatur für Lignoceryl-SM ein solches "monolayer-coupling" nachweist, für Palmitoyl- wie Stearoyl-SM aber ausschließt. Aus

Röntgenstrukturanalysen bei 20°C eines in seiner genauen chemischen Zusammensetzung nicht analysierten RHSM dagegen folgerten Khare und Worthington (30), daß keine - und wenn doch, nur geringe - Interdigitationen zwischen den beiden Layern vorliegen.

1.1.7. Physikalische Membraneigenschaften

1.1.7.1. Mechanische Stabilität

Obwohl Membranen mit höherem SM-Gehalt unter isoosmotischen Verhältnissen eine deutlich höhere Rigidität zeigen und nur schwerer zu deformieren sind, wiesen Versuche mit Erythrozyten verschiedener Säugerarten (2) und mit multilamellaren Liposomen (25) darauf hin, daß SM wohl eher zu einer gesteigerten osmotischen Fragilität führt. Borochov et. al. (7) wiesen dagegen aber eine höhere osmotische Membranfragilität von Schafserythrozyten nach, deren PC : SM - Verhältnis künstlich erhöht wurde.

1.1.7.2. Permeabilität

Wie bei Erythrozyten verschiedener Säugerarten die Permeabilität für kleine ungeladenen Teilchen mit steigendem SM-Gehalt sinkt, so stellten Hertz und Barenholz (25) auch für aus Rinderrückenmark-SM hergestellte multilamellare Liposomen, in die Glukose eingeschlossen war, eine nicht meßbare Glukosefreisetzung über einen weiten Temperaturbereich fest; multilamellare Lecithin-Liposomen setzten aber merklich Glukose frei. Auch schwollen die Lecithin-Liposomen unter Hypoosmolarität deutlicher an als solche aus SM, woraus Hertz und Barenholz schlossen, daß die untersuchten SM-Membranen für Wasser weniger durchlässig waren. Tirri et. al. (62) ermittelten zwar für Oleoyl-dihydro-SM-Membranen einer geringere Aktivierungsenergie, die zum Durchtritt von Glycerol durch die Membran nötig ist, als für Membranen aus Diester- bzw. Diäther-PC mit gleicher effektiver Acyl-Kettenlänge; die Glycerol-Durchlässigkeit der SM-Membranen war aber dennoch niedriger.

1.2. Sphingomyelin und Gallensäure-Resistenz

1.2.1. Der relativ hohe SM-Anteil an den Membranphospholipiden der Gallenkanalmembran

Die Membran einer Leberzelle läßt sich in drei verschiedene funktionelle Einheiten aufgliedern (21), in

a) die sinusoidale Membran (SIM), die den Hepatozyten zum Dissé'schen Raum hin abgrenzt und mit ihren Mikrovili eine große Kontaktoberfläche mit der Blutflüssigkeit darstellt,

b) die laterale Plasmamembran (LPM) mit ihren tight junctions, Desmosomen und gap junctions und in eben

c) die Gallenkapillarmembran (BCM), die ebenfalls Mikrovili besitzt.

Zwei neue eingehende Studien (33 , 36) über die Zusammensetzung der verschiedenen funktionellen Einheiten der Hepatozytenmembran der Ratte ergeben für die BCM den signifikant höchsten SM-Gehalt. Ihnen widersprechen allerdings zwei ältere Arbeiten, deren Trennungsverfahren noch nicht ausgereift war und in denen nicht zwischen LPM und SIM unterschieden wurde; letztere weisen zwar einen relativ hohen SM-Ge-

---

Tabelle 3 : SM-Gehalt der drei funktionellen Einheiten der Hepatozytenmembran der Ratte in mol% der Gesamtphospholipide. In Klammern sind zum Vergleich die gerundeten Werte für Lecithin / Phosphatidyl-Äthanolamin / Phosphatidyl-Serin + Phosphatidyl-Inositol angegeben.

Quelle	BCM	basolaterale Plasmamembran	
		LPM	SIM
(36)	23,9 ± 1,6		14,3 ± 2,1
	(39/26/10)		(39/32/10)
(33)	24,4 ± 0,5	15,6 ± 1,1	12,8 ± 0,9
	(33/14/15)	(32/20/17)	(47/15/14)
(73)	20,3 ± 3,1		20,6 ± 1,3
	(33/22/23)		(30/23/23)
(72)+	17 ± 2		20 ± 6
	(31/22/25)		(28/23/23)

+ aus einem Graphen ermittelte Werte

halt der BCM nach; dieser unterscheidet sich hier aber nicht vom SM-Gehalt der restlichen Hepatozytenmembran (73) bzw. erweist sich als niedriger (72). Diese 4 Studien differieren auch noch in anderen wesentlichen Ergebnissen (Lipid : Protein - Verhältnis, Cholesterol : Phospholipid - Verhältnis). (s. Tab. 3)
Auch in der BCM ist das SM besonders im "outer layer" der Membran angereichert - in dem Teil der Membran also, der direkt dem Gallensäure-Angriff ausgesetzt ist. Higgins und Evans (27) fanden einen Anteil von 67% des SMs der gesamten BCM im "outer layer". Sie errechneten eine Phospholipid-Zusammensetzung des "outer layer" von 19% Phos- phatidyläthanolamin, 23% SM und 59% Lecithin.

Tabelle 4 : Taurocholat- (TC) und Glykocholat- (GC) Konzentrationen, die einen 10%igen Phospholipid-Release aus menschlichen bzw. Schafs-Erythrozyten bewirken, und die Phospholipid-Zusammensetzung der Zellmembranen dieser Erythrozyten. In Klammern sind die Werte für Lecithin / Phosphatidyl-Äthanolamin / Phosphatidyl-Serin + Phosphatidyl-Inositol angegeben.

Erythrozyten	SM-Gehalt (mol%)	TC (mmol/l)	GC (mmol/l)	Quelle
Mensch	25 (30/25/13)	$6\frac{1}{2}$	$12\frac{1}{4}$	(13)
Schaf	49 (1/35/12)	$23\frac{1}{4}$	$22\frac{1}{2}$	(4)

1.2.2. Die höhere Gallensäure-Resistenz von Membranen mit höherem SM-Gehalt

Menschliche und Schafs-Erythrozyten wurden Gallensäuren ausgesetzt und gaben dabei bei auffallend verschiedenen Gallensäure-Konzentrationen Phospholipide in die Lösung ab bzw. wurden bei auffallend differierenden Gallensäure-Konzentrationen hämolysiert (4 , 13). Dabei erwiesen sich Schafs-Erythrozyten als wesentlich stabiler als menschliche. Interessant ist nun, daß Schafs-Erythrozytenmembranen sehr viel mehr SM enthalten als menschliche. (s. Tab. 4)

Diese größere Gallensäure-Resistenz von Schafs-Erythrozyten im Vergleich zu menschlichen Erythrozyten zeigte sich auch bei der Inkubation der Erythrozyten mit natürlich vorkommenden, von Säugern gewonnenen Gallen (15).
Spätere Versuche von Coleman et. al. (16) mit Erythrozyten auch anderer Säugetierarten ergaben eine deutliche Abhängigkeit der Membranresistenz von ihrem SM-Gehalt. (s. Abb. 3)

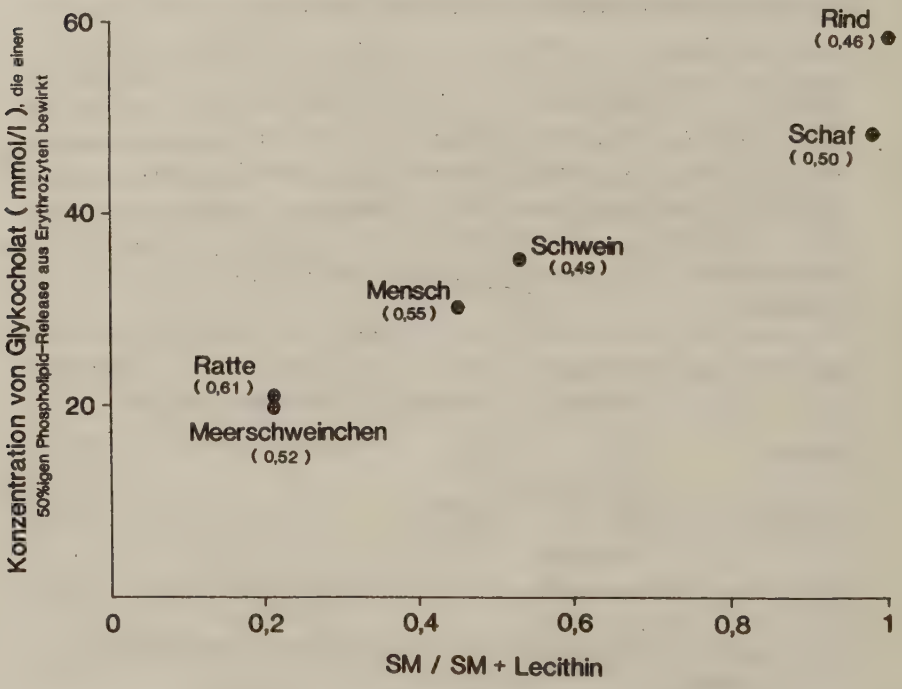


Abbildung 3 : Korrelation von SM-Gehalt der Erythrozyten verschiedener Säugetierarten und ihrer GC-Resistenz; Werte aus (16). Die Werte wurden aus Graphen ermittelt. Die Werte in Klammern geben den molaren Anteil von SM und Lecithin an der Gesamtheit der Membran-Phospholipide an.

Da sich aber alle Erythrozyten-Populationen außer in der Phospholipid-Zusammensetzung noch in einer Reihe anderer Eigenschaften unterscheiden (Schafserythrozyten haben z.B. ein Volumen von durchschnittlich 30µm^3, menschliche Erythrozyten von 87µm^3.) erhöhten Coleman et. al. (16) künstlich den Lecithin-Gehalt ein und derselben Erythrozyten-Population, nämlich von Schafserythrozyten, was ebenfalls eine deutliche Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber Gallensäuren bewirkte (s. Abb. 4).

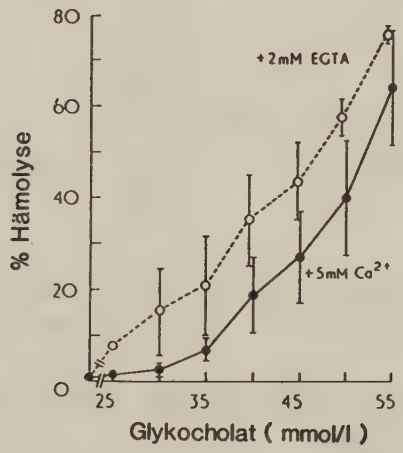
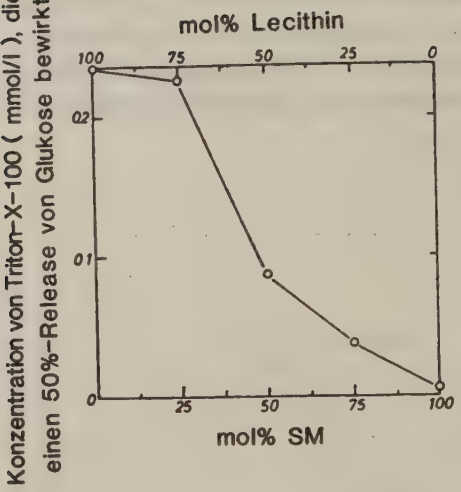


Abbildung 4 : Verringerung der Resistenz von Schafserythrozyten gegenüber der Hämolyse durch GC nach Erniedrigung des SM/SM + Lecithin - Quotienten (von 0,97 auf 0,87 durch Inkubation mit menschlichen Plasma-Lipoproteinen und Hemmung der Phospholipase durch EGTA); aus (16).

Zu ganz anderen Ergebnissen kamen Hertz und Barenholz (26), die für das allerdings nicht-ionische Detergens Triton-X-100 eine deutliche Abnahme der Resistenz multilamellarer Liposomen bei steigendem SM : Lecithin - Verhältnis nachwiesen (s. Abb. 5).

a)



b)

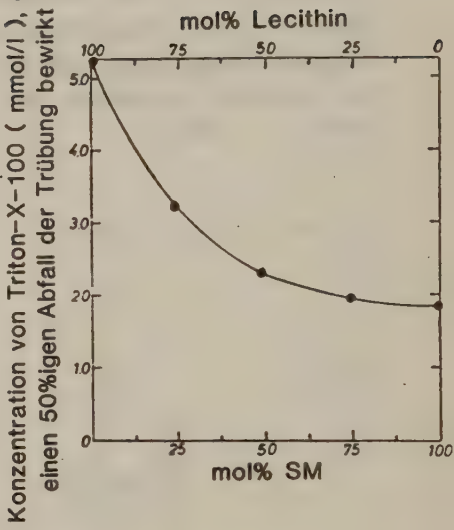


Abbildung 5 : Ein steigender SM-Gehalt von multilamellaren Liposomen verringert die Resistenz gegenüber Triton-X-100; aus (26).

a) Freisetzung von in die Liposomen eingeschlossener Glukose (Permeabilisierung)

b) Abfall der Trübung (Solubilisierung)

1.2.3. Der geringe Anteil von SM an den Phospholipiden, die durch Gallensäure-Einwirkung aus Membranen freigesetzt werden.

Daß die BCM gegenüber dem Gallensäure-Angriff tatsächlich stabiler ist als die restliche Plasmamembran, belegt eine Studie von Yousef und Fisher (73); für Dihydroxy-Gallensäuren zeigt sich dieser Effekt allerdings erst bei hohen Konzentrationen - ein Hinweis auf ein metastabiles Verhalten der BCM: gerade die aus der BCM emulgierten Substanzen scheinen besonders membranprotektiv zu wirken. Dieses Fließgleichgewicht wird auch dadurch belegt, daß der Lecithin-turnover in der BCM mit Abstand der höchste ist und die über die Zeitachse

aufgetragenen Aktivitäten von radioaktiv markiertem Lecithin in BCM und Galle (zweigipflig) parallel verlaufen, was auch die These, daß die Phospholipide der Galle aus der BCM stammen, unterstützt. Auch das Vorhandensein beträchtlicher Aktivitäten von in der BCM lokalisierten Enzymen in der Galle (22) deutet darauf hin, daß ein gewisser Anteil der Proteine und Phospholipide nicht aktiv sezerniert, sondern aus der BCM herausemulgiert werden. Wird von dieser Hypothese ausgegangen, so fällt auf, daß die Galle nur sehr wenig SM enhält - viel weniger als dem SM-Gehalt der BCM entsprechen würde: Evans et. al. (22) bestimmten einen SM-Anteil an den Gesamtphospholipiden von nur 3,9% für die Ratten-Galle, aber von 14,0% für die BCM der Ratte. Spitzer et. al. (59) fanden nur Spuren von SM in der Rattengalle. (Für die menschliche Galle ergaben sich sogar noch geringere Werte von 2,52mol% (40), 0,4mol% in der Leber- bzw. 0,2mol% in der Blasen-Galle (69) und Werte unterhalb der Grenze der Messbarkeit (59).)

Coleman et. al. (15) wiesen darauf hin, daß in allen von ihnen untersuchten Säugetier-Gallen Lecithin über 80% der Gesamt-Phospholipide ausmachte (mit Ausnahme von Schafsgalle, die einen beträchtlichen Anteil Lyso-Lecithin enthält).

Auch bei der Gallensäure-Inkubation von Homogenaten von Ratten-BCM selbst zeigte sich, daß aus der BCM nur sehr geringe Mengen SM freigesetzt werden (73). Dieser Effekt zeigte sich aber in nur sehr abgeschwächter Form für die restlichen Membrananteile (LPM und SIM).

Auch bei der Inkubation von menschlichen Erythrozytenmembranen mit verschiedenen Detergentien zeigte sich - allerdings am ausgeprägtesten bei Triton-X-100 - Inkubation - eine im Vergleich zu den anderen Phospholipiden verzögerte Solubilisierung von SM (14 , 32). Nach Billington und Coleman (3) bewirkt GC bei niedrigen Konzentrationen eine Freisetzung von vornehmlich mikrovesikulärem Material mit relativ niedrigem SM-Gehalt, der der Zusammensetzung der Gesamtmembran ähnelt, bei höheren Konzentrationen eine Freisetzung von vornehmlich gelöstem Material, dessen höherer SM-Gehalt dem des "outer leaflet" der menschlichen Erythrozytenmembran ähnelt.

Dem widersprachen aber schon Versuche, bei denen Erythrozyten mit Gallensäuren inkubiert wurden. Bei einer GC-Konzentration, die noch keine Hämolyse menschlicher Erythrozyten bewirkte, fand sich hierbei in der Lösung ein SM-Anteil am freigesetzten Membranlipid, der dem in

der urspünglichen Membran entsprach (13). Bei der Inkubation von Schafs-Erythrozyten mit sublytischen Gallensäure-Konzentrationen zeigte sich sogar ein besonders hoher SM-Anteil im Überstand (4). (Wurden aus Schafs-Erythrozyten hergestellte "unsealed ghosts" verwendet, bei denen auch das "inner leaflet" mit seinem geringen SM-Gehalt dem Gallensäure-Angriff ausgesetzt wurde, erniedrigte sich allerdings der SM-Gehalt im Überstand geringfügig.)
Des weiteren könnten eventuell eher als Gegenargument gegen die These, daß SM die Gallensäure-Resistenz von Membranen erhöht, weitere Ergebnisse der Studie gewertet werden, die allerdings eine deutliche Korrelation von SM-Gehalt und Gallensäure-Resistenz von Säugetier-Erythrozyten ergab: Sie besagen, daß aus Erythrozyten umso mehr Material in gelöster Form und umso weniger Material in partikularer Form freigesetzt wird, je mehr SM die Erythrozyten-Membran enthält (16).

1.3. Aufgabenstellung dieser Arbeit

Über den Einfluß des SM-Gehalts von BCM, Erythrozyten- und Liposomen-Membranen auf deren Gallensäure-Resistenz bestehen starke Widersprüche. Viele dieser Membransysteme zeigen eine asymmetrische Organisation. Mit dieser Arbeit werden erste Studien über die Gallensäure-Resistenz von Modell-Membranen aus Eidotter-Lecithin und verschiedenen Sphingomyelinen mit annähernder Gleichverteilung in den beiden Monolayern der Membran vorgelegt. Als Modell-Membranen dienen hier große unilamellare Liposomen.

1.4. Bisherige Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von Gallensäuren mit Membranen - Liposomen als Modell-Membranen

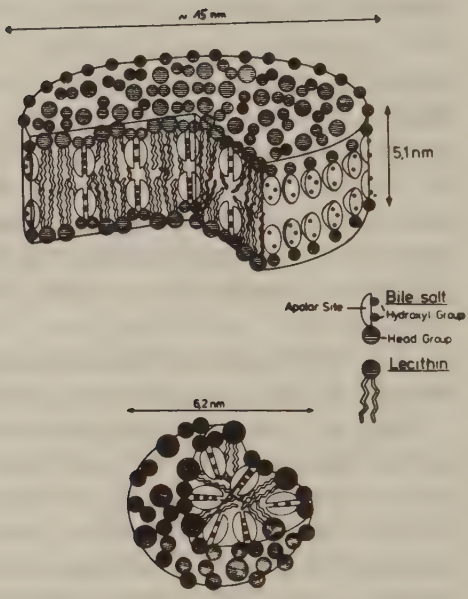
Bisherige Erkenntnisse geben folgendes Bild von der Interaktion von Cholat mit Lecithin-Bilayers:
1) In niedrigen Konzentrationen lagert sich Cholat bei Zugabe zu Liposomen in deren äußeren Monolayer als Monomer ein, das flach auf der Membran schwimmt, und bildet ein Aggregat mit 6 umgebenden Lecithin-Molekülen. Oberhalb eines Verhältnisses von 1 Cholat- auf 20 Lecithin-Moleküle ist die Einlagerung weiterer Cholat-Moleküle in die Membran behindert (51).

2) Ab einer bestimmten Konzentration von Cholat im "outer layer" schlagen Cholat-Moleküle in den "inner layer" um, der bisher noch kein Cholat enthielt. Dabei entstehen kurzfristig Löcher in der Membran, durch die auch größere in den Liposomeninnenraum eingeschlossene Moleküle (z.B. Inulin) austreten können. Da es sich bei jedem Umschlagen um eine einmalige kurzfristige Permeabilisierung handelt, ist die Zahl dieser freigesetzten Moleküle nicht zeitabhängig. Die Größe der plötzlich freisetzbaren Moleküle korreliert mit dem Cholat-Gehalt der liposomalen Membran. Die Membranordnung der cholat-permeabilisierten Membran ist geringer als die der cholatfreien Membran. (51 , 53)

3) Noch höhere Cholat-Konzentrationen bewirken eine Aufspaltung der Membran in kleine Plattenstücke. Diese gemischten discoiden Micellen (s.Abb. 6) sind Bilayer-Platten mit einer nahezu der cholatfreien Membran entsprechenden Membranordnung. Sie werden an ihrem Rand von Cholat-Molekülen umschlossen; Cholat-Moleküle sind wohl aber auch zwischen den Lecithin-Molekülen dieser Membranplatten eingelagert. Gemischte Micellen sind ab einem molaren Cholat : Lecithin-Verhältnis von 0,3 : 1 zu finden. Steigt das Verhältnis werden die Plattenstücke kleiner. Cholat weist jetzt ein positiv kooperatives Bindungsverhalten auf. (12 , 35 , 39 , 51 , 58 , 63)

4) Bei höchsten Cholat-Konzentrationen - ab einem Cholat : Lecithin-Verhältnis von etwa 2 : 1 in diesen Partikeln - entstehen kleinste (Durchmesser ca. 6 nm) gemischte ellipsoide Micellen (s. Abb. 6) mit nur noch minimaler Anisotropie. (12 , 35 , 39 , 51 , 58)

Mit der Methode von Schubert et. al. (53) lassen sich Permeabilisierung und Solubilisierung der Liposomen-Membran gut parallel verfolgen(s.Abb.7), wenn im Puffer, der den Liposomeninnernraum ausfüllt, ^{3}H-markiertes Inulin gelöst ist, und wenn ein Teil der Membranmoleküle mit einem mit einer anderen Energie zerfallenden Isotop markiert ist (hier ^{14}C-Lecithin). Gallensäure-Puffer-Liposomen-Gemische werden ultrazentrifugiert, um die schweren Liposomen vom Überstand abzutrennen. Die in ihrer Membrankontinuität noch erhaltenen Liposomen bilden am Boden der Zentrifugenröhrchen ein sichtbares Pellet. Durch die Ultrazentrifugation wird allerdings die durch Cholat schon destabilisierte Membran zusätzlich noch geringfügig geschädigt, sodaß bei dieser Methode bei um ca. 25% geringeren



discoide gemischte Micelle

ellipsoide gemischte Micelle

Abbildung 6 : Schematische Darstellung von discoiden und ellipsoiden gemischten Micellen; aus (39).

Gallensäure-Konzentrationen eine Permeabilisierung auftritt als bei der säulenchromatographischen Abtrennung der Liposomen. Auf die Solubilisierung hat die Ultrazentrifugation keinen Einfluß. Im Überstand wird die ^{3}H-Aktivität, die für das freigesetzte Inulin und damit für die Permeabilisierung steht, und die ^{14}C-Aktivität der leichten nicht absedimentierten gemischten Micellen, die den emulgierten Membrananteil und damit die Solubilisierung wiederspiegelt, gemessen.

Werden die Meßergebnisse als prozentuale Bruchteile der maximal möglichen ^{3}H- bzw. ^{14}C-Aktivität graphisch dargestellt, so ergeben sich zwei sigmoide Kurven, wobei die linke für die Permeabilisierung und die rechte für die Solubilisierung der Membran steht (s.Abb. 7).

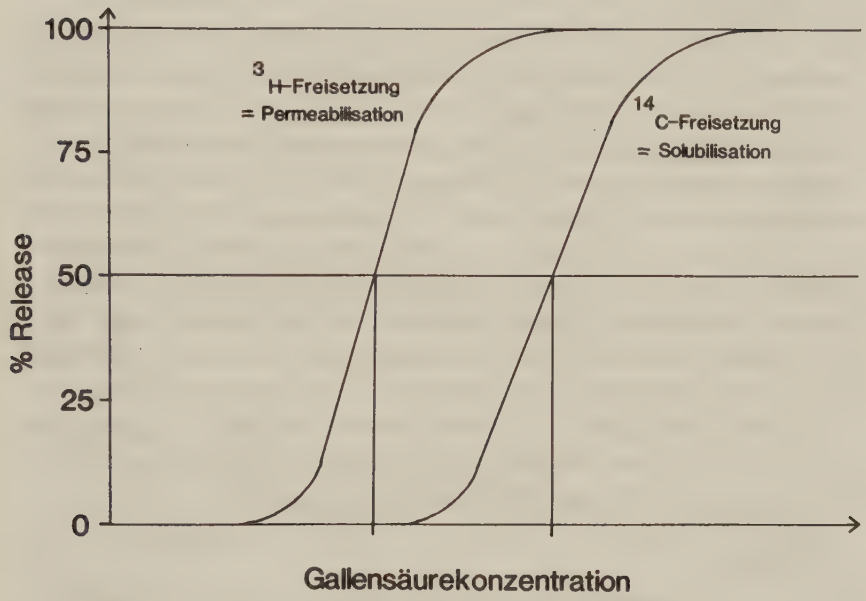


Abbildung 7 : Schematische Darstellung der Freisetzung von ^{3}H-Inulin bzw. ^{14}C-Lecithin aus den Liposomen durch Gallensäurelösungen steigender Konzentration.

Eine große Anzahl von Versuchsreihen läßt sich einfacher miteinander vergleichen, wenn für jede Meßreihe die Gallensäure-Konzentration, die eine 50%ige Permeabilisierung bewirkt, und die Gallensäure-Konzentration, die eine 50%ige Solubilisierung bewirkt, mittels Interpolation bestimmt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Alle Lösungen wurden mit einem durchweg verwendeten Phosphat-Puffer hergestellt (10 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, mit 1 N Salzsäure auf pH 7,35 eingestellt). Die Liposomen wurden hergestellt aus aus frischem Eigelb gewonnenem Lecithin und Sphingomyelin, gewonnen aus Eigelb, Rinderhirn bzw. Schweine-Erythrozyten (Firma Sigma). Zur radioaktiven Markierung wurde ^{3}H-Inulin, ^{14}C-Sphingomyelin und ^{3}H-Lecithin der Firma NEN und ^{14}C-Lecithin der Firma Amersham Buchler verwendet. Na-Cholat stammte von der Firma SERVA und wurde zweimal aus Methanol umkristallisiert. Als Fluoreszenzmarker zur Messung der Anisotropie der Liposomenmembranen diente 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien der Firma Sigma. Die Gallensäuren Na-Taurocholat und Na-Glykocholat wurden von der Firma Sigma bezogen. Als Szintillationsflüssigkeit wurde Unisolve 1 der Firma Zinsser verwendet. Alle anderen nicht eigens aufgeführten Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad p.a. verwendet.

2.1.2. Geräte

Die zur Liposomenpräparation benötigten Lecithin-Sphingomyelin-Cholat-Gemische wurden an einem Rotationsverdampfer der Firma Büchi und anschließend an einem Lyophilisator der Marke Christ Typ Beta 1 getrocknet. Die Liposomen für die Zentrifugenläufe wurden in einem käuflichen speziellen Dialysegerät,dem LIPOPREP der Firma Dianorm, die kleinen Mengen nicht radioaktiv markierter Liposomen im MINI-LIPOPREP der Firma Dianorm hergestellt. Die darin verwendeten hochpermeablen Dialysemembranen stammten von der Firma Diachema. Das radioaktive Inulin wurde säulenchromatographisch auf Sepharose 4B-CL - Gel abgetrennt. Für analytische Läufe wurde auch Sepharose 2B-CL - Gel verwendet. Das gesamte Material für die Säulenläufe und auch der Fraktionssammler stammten von der Firma Pharmacia. Das Photometer war ein 2158 Uvicord SD der Firma LKB Bromma. Zur Abtrennung des Inulins dienten bei einem Teil der Präparationen der 40% SM enthaltenden Liposomen Filter der Firma Millipore S.A. vom Typ VSWP mit einer Porengröße von 0,025 µm.

Für die Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen wurden die Proben in Kristallschliffküvetten der Firma Hellma Typ 101-OS gegeben und in einem

mit einem Temperierelement ausgestatteten Fluoreszenz-Spektrometer der Marke Perkin-Elmer MPF-3 gemessen.
Die Liposomengröße wurde mit einem NANOSIZER der Firma Coulter Electronics bestimmt.
Die Ansätze für die Zentrifugenläufe wurden in Dickwandpolycarbonat-Zentrifugenröhrchen der Firma Beckman pipettiert und bei Bedarf in einem Wasserbad der Firma Kottermannn temperiert. Die hier auch nötige Temperierung des Rotors wurde in einem Brutschrank der Marke Heraeus Typ RB 360 vorgenommen. Der 50.3 Ti-Rotor mit 18 Löchern, sowie die Ultrazentrifuge Typ L5-75 stammten von der Firma Beckman.
Zur Szintillationsmessung wurden Szintillationsfläschchen der Firma Greiner Labortechnik (27,0 / 60 mm) verwendet. Die Messungen wurden in einem ß-Counter Tricarb-Spektometer der Firma Packard durchgeführt.

2.2. Methoden

2.2.1. Liposomenpräparation und Säulenläufe

Die unilamellaren Liposomen wurden nach der von Milsmann et. al. (38) beschriebenen Methode der schnellen und kontrollierten Dialyse hergestellt.
Zur Liposomenpräparation wurde jeweils 104 mg Lipid verwendet. Dieses setzte sich aus dem jeweils gewünschten molaren Prozentanteil SM und dem entsprechenden molaren Prozentanteil Eidotter-Lecithin zusammen. Das Lecithin wurde als Lösung von 100 mg in 1 ml Chloroform in einen Rundkolben pipetiert; das SM wurde fest eingewogen. Zur radioaktiven Markierung des Lipids wurde ^{14}C-Lecithin einer Aktivität von 0,3 µCi, was bei einer spezifischen Aktivität von 50 mCi / mmol etwa 6 nmol entspricht, als Lösung in Toluol und Äthanol (1 : 1) zugesetzt. 97 mg doppelt umkristallisierten Na-Cholats wurden zugegeben. Dieses Gemisch wurde in 10 ml Methanol aufgenommen und gelöst. Die Lösung wurde 10 min an einem Rotationsverdampfer - bis das Lösungsmittel entfernt war - eingedampft und danach 2 h lyophilisiert. Anschließend wurde das Substrat in 8 ml eines Puffers aufgenommen, dem ^{3}H-Inulin einer Aktivität von 100 µCi auf 100 ml zugesetzt war, was bei einer spezifischen Aktivität von 100 mCi / mg etwa einer Konzentration von 2 nmol / l entsprach.
7 dieser 8 ml wurden in die Dialyse-Kammer des LIPOPREP zwischen zwei hochpermeable Dialyse-Membranen mit einer Ausschlußgrenze von einem MG

von 10.000 gegeben, an deren Außenfläche der Dialyse-Puffer entlangfloß. Bei der ersten Dialyse wurden als Dialyse-Puffer 80 ml des oben beschriebenen ^{3}H-Inulin-Puffers während 3 h im Kurzschluß mehrmals umgewälzt. Dadurch verringerte sich die Cholat-Konzentration in der Dialyse-Kammer auf etwa ein Zehntel des Ausgangswerts und es bildeten sich die Liposomen. Diese erste Dialyse wurde zur Präparation von 0 - 40% SM enthaltenden Liposomen (0 - 40ESM-Liposomen) bei Zimmer-Temperatur (20 - 25°C), zur Präparation von 30 und 40% SM enthaltenden Liposomen (30- bzw. 40ESM-Liposomen) bei 40°C und zur Präparation von 50- und 65ESM-Liposomen bei 53°C durchgeführt. Anschließend wurde eine zweite Dialyse bei Zimmer-Temperatur über 12 h mit reinem nicht Inulin-haltigen Puffer durchgeführt, der, nachdem er an der Kammer vorbeigeflossen war, sofort verworfen wurde. Dadurch wurde dem Dialysat, in dem die Liposomen suspendiert waren, fast das ganze darin noch gelöste Cholat entzogen; in den Membranen verblieben danach nur noch etwa 1 Cholat-Molekül auf 100 Phospholipid-Moleküle.

Zur vollständigen Abtrennung des H-Inulins von den Liposomen und zur Beurteilung der Homogenität der Liposomen-Präparationen wurden Säulenläufe angeschlossen. Die mit Sepharose 4B-CL - Gel gefüllte Säule der Ausmaße 16 x 700 mm wurde vom Puffer mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,33 ml / min durchströmt. Extinktionsphotometrische Elutionskurven wurden aufgezeichnet. Das Eluat wurde in einem Fraktions-Sammler aufgefangen. Die ersten 15 - 20 ml getrübter Flüssigkeit wurden entnommen und vereinigt.

Einem Teil der bei Zimmer-Temperatur hergestellten 40ESM-Präparationen wurde das ^{3}H-Inulin nicht säulenchromatographisch sondern mittels Filter mit einer Porengröße von 25 nm abgetrennt. Diese Filter schwammen auf der Pufferflüssigkeit, die in große Petrischalen gegeben worden war. Eichversuche ergaben, daß Inulin die Filter mit einer Halbwertszeit von 1,5 h durchwanderte. So wurde während 12 h filtriert; zweimal wurde in dieser Zeit der Puffer gewechselt. Die Liposomen-Suspension war als Tropfen von 300 µl den Filtern aufgesetzt. Nach den 12 h wurden die Tropfen abpippetiert, zusammengegeben und 1:4 mit Puffer versetzt.

Zum ausschließlichen Zweck der Homogenitätsanalyse wurden Liposomen mit hohem ESM-Gehalt bei verschiedenen Temperaturen auch mit dem MINI-LIPOPREP hergestellt. Die zu dialysierende Lösung wurde wie oben

- aber ohne radioaktive Markierung - vorbereitet. Die Dialyse-Kammer, die nur eine Dialyse-Membran besitzt, wurde mit nur 1 ml Flüssigkeit beschickt und rotierte in einem im Wasserbad temperierten Puffer-Gefäß, das mit ca. 100 ml reinem Puffer gefüllt war. Nach 3 h wurde der Puffer ausgetauscht und es wurde nochmals über 3 h dialysiert. Analytische Säulenläufe wurden mit einer mit Sepharose 2B-CL - Gel gefüllten Säule (9 x 600 mm) bei einer Flußgeschwindigkeit des Puffers von 0,15 ml / min durchgeführt.

2.2.2. Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen

Da ein Gerät zur Messung nach der Nanosekunden-Fluoreszenz-Anisotropie-Technik nicht zur Verfügung stand und da die steady-state-Fluoreszenz-Anisotropie über einen weiten Bereich sich proportional zur Membranordnung verhält, wurde die steady-state-Technik zur Bestimmung der Übergangstemperaturen verwendet.

2 µl einer Lösung von 11,6 mg 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien (DPH) in 1 ml Tetrahydrofuran wurden am Lyophilisator getrocknet, anschließend in 6 ml Puffer aufgenommen und durch Ultraschall-Beschallung feinst dispergiert. 2,55 ml dieser Suspension wurden einem ml Liposomensuspension zugesetzt (molares Verhältnis Phospholipid : DPH = 400 : 1) und 12 h inkubiert. Danach wurden 0,2 ml des Inkubats mit 1,8 ml Puffer verdünnt. Die Proben wurden zuerst erwärmt und während der Messungen langsam bis auf die tiefste erreichbare Temperatur von ca. 13°C gekühlt. Angeregt wurde mit einem Licht von 366 nm Wellenlänge bei einer Spaltbreite von 10 nm; die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 430 nm und einer Spaltbreite von 10 nm gemessen. Das Fluoreszenzlicht wurde in einem Winkel von 90° zur Einfallsrichtung des Anregungslichts, das polarisiert wurde, gemessen - und zwar jeweils in der Polarisationsebene des Anregungslichts sowie in der senkrecht dazu stehenden Polarisationsebene.

Die Störung durch Streuung des Anregungslichts wurde durch Subtraktion des Streuwerts nicht DPH-markierter Liposomensuspensionen von der jeweiligen Fluoreszenzintensität rechnerisch ausgeglichen. Der Störeffekt durch Streuung des Fluoreszenzlichts wurde durch die sehr geringe Konzentration der Membran-Suspension minimiert. Die steady state -Fluoreszenz-Anisotropie r_s ergibt sich aus der Formel:

$$r_s = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \text{,wobei}$$

$I_{\parallel}$ = Fluoreszenz-Intensität in der Polarisationsebene des Anregungslichts
$I_{\perp}$ = Fluoreszenz-Intensität in der Polarisationsebene senkrecht zu der des Anregungslichts

2.2.3. Größenbestimmung der Liposomen
Sie wurde mittels Laser-Autokorrelations-Spektroskopie vorgenommen. Dazu wurden jeweils 50 µl Liposomensuspension mit 1 ml Puffer verdünnt. 5 min wurden diese Verdünnungen im Nanosizer auf Umgebungstemperatur temperiert. Es wurde der Meßbereich 40 - 150 nm gewählt; 4 min lang wurde jeweils gemessen.

2.2.4. Inkubationsversuche mit Gallensäuren
Für jede Meßreihe wurden 18 Polycarbonatröhrchen mit je 2 ml Gallensäure-Puffer-Liposomen-Gemisch angesetzt. Zunächst wurden die für die gewünschten Gallensäure-Konzentrationen in 2 ml Lösung nötigen Volumen einer vorher mit Puffer angesetzten 10 mmolaren Gallensäure-Stammlösung pipettiert. Die Gallensäure-Konzentrationen wurden dabei so gewählt, daß in den vermuteten Bereichen der Kurvenanstiege die einzelnen Gallensäure-Konzentrationen besonders eng beieinander lagen. Mit reinem Phosphat-Puffer wurde dann bis 1,8 ml aufgefüllt und gründlich gemischt. Erst zum Schluß wurden die restlichen 0,2 ml als Liposomen-Suspension in Puffer zugesetzt. Diese Reihenfolge ist erforderlich, weil bei Zusatz der Gallensäure zu den Liposomen-Suspensionen im Durchmischungsbereich viel zu hohe Gallensäure-Konzentrationen entstehen würden, die eine Liposomenzerstörung schon bei niedrigeren Gallensäure-Konzentrationen vortäuschen würden.
Für Meßreihen, die nicht bei Zimmer-Temperatur durchgeführt wurden, wurden die Gallensäure-Puffer-Verdünnungen und getrennt davon die Liposomen-Suspensionen in einem Wasserbad auf den oberen Wert des jeweiligen Temperaturbereichs temperiert und erst anschließend wurden die Liposomensuspensionen einpipettiert. Die Gemische wurden jeweils intensiv gemischt (gevortext) und sofort in den Rotor gegeben, der - zu Versuchen bei höheren Temperaturen als Zimmer-Temperatur - in einem

Brutschrank ebenfalls auf den oberen Wert des gewünschten Temperaturbereichs temperiert war.
Die Mischungen wurden unmittelbar nach ihrem Ansatz für 3 h bei 40.000 rpm, was einer Beschleunigung von 143.200 g entspricht, sedimentiert. Die Zentrifugenläufe wurden im jeweils gewünschten Temperaturbereich von 20 - 25°C, 35 - 40°C bzw. 40 - 45°C durchgeführt.
Anschließend wurde vorsichtig - ohne das Pellet aufzuwirbeln - je 1 ml des Überstands aus jedem Röhrchen entnommen und in Szintillatorfläschchen (1 - 18) gegeben. Als 0%-Wert, als Background, wurde 1 ml reinen Phosphatpuffers (0) in ein Szintillatorfläschchen pipettiert. Für den 100%-Wert wurden 0,2 ml Liposomen-Suspension der im dazugehörigen Lauf verwendeten Liposomen-Population zu 1,8 ml Puffer zugesetzt und gut vermischt. Von diesem unzentrifugierten Gemisch wurde ebenfalls 1 ml in ein Szintillationsfläschchen gegeben (19). Letzteres Gemisch hat den maximal erreichbaren Wert an ^{3}H- und ^{14}C-Aktivität.
Diese 20 aus je 1 ml Lösung bestehenden Proben wurden nun mit je 9 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt und durchmischt. Die Szintillatorfläschchen wurden im ß-Counter in drei Durchgängen gemessen, wobei maximal 10.000 counts gezählt wurden, was einen größten möglichen Fehler von 1% ergibt; die Zählzeit war aber auf jeden Fall auf 10 min begrenzt. Von den drei Durchläufen wurde wegen der hohen Störanfälligkeit der Messungen gegenüber Lichtexposition (v.a. beim Transport) jeweils der mit dem niedrigsten Background verwendet. Nach einem Quench-Korrektur-Programm wurde unter Berücksichtigung der zugehörigen 0%- und 100%-Werte die Freisetung von ^{3}H- und ^{14}C-Aktivität in Prozent des theoretischen Maximal-Releases berechnet. Jeder Versuch wurde durch einen Kontrollauf mit komplett neuem Material bestätigt. Bei großen Abweichungen wurde ein dritter Lauf angesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der verwendeten Liposomen

3.1.1. Gegenüberstellung der verschiedenen SM-Präparate

3.1.1.1. Chemische Zusammensetzung

Die gaschromatographische Analyse der Seitenketten der zu Verfügung stehenden Präparate (Rinderhirn (RH) -SM, Schweineerythrozyten (SE) -SM, Eidotter (E) -SM und Eidotter-Lecithin) ergab (s. Tab. 5):

Tabelle 5 : Prozentuale Anteile der verschiedenen Fettsäuren an den gesamten Acyl-Seitenketten der verschiedenen Phospholipid-Präparate

Fettsäuren	Eidotter-Lecithin	RHSM	SESM	ESM
16:0	42,33	4,54	22,55	73,51
16:1	0,31	-	-	-
18:0	13,80	36,87	6,79	8,86
18:1	28,17	1,50	1,21	1,49
18:2	11,02	0,75	1,51	1,57
20:0	-	0,97	3,34	2,17
20:1	2,36	0,91	2,71	1,15
20:4	1,92	1,28	2,92	1,23
22:0	-	3,11	9,91	3,32
24:0	-	8,56	28,51	1,00
24:1	-	41,51	20,61	5,69
	99,91	100,00	100,06	99,99
Ø Fettsäurenlänge	17,23	21,10	21,07	17,15
Ø cis-Doppelbindungen pro Molekül	1,21	0,51	0,39	0,16

3.1.1.2. Auswahl des zu verwendenden Präparats

In Vorversuchen wurden Liposomen mit 30%igem SM-Anteil aus jeweils einer von drei zur Verfügung stehenden SM-Präparaten hergestellt und bei 20 - 25°C mit Cholat (C), Taurocholat (TC) bzw. Glykocholat (GC) inkubiert, um

- die Wirkung des SM-Anteils abschätzen zu können,
- einen Überblick über den Einfluß der variablen Seitenkette des SM auf die Membranstabilität zu erhalten, und um
- die SM-Präparation mit dem deutlichsten Effekt auf die Membranstabilität für eine eingehendere konzentrationsabhängige Studie zu ermitteln.

Die Werte für Permeabilisierung und Solubilisierung dieser Liposomen sind im folgenden dargestellt (s. Abb. 8 , 9 , 10):

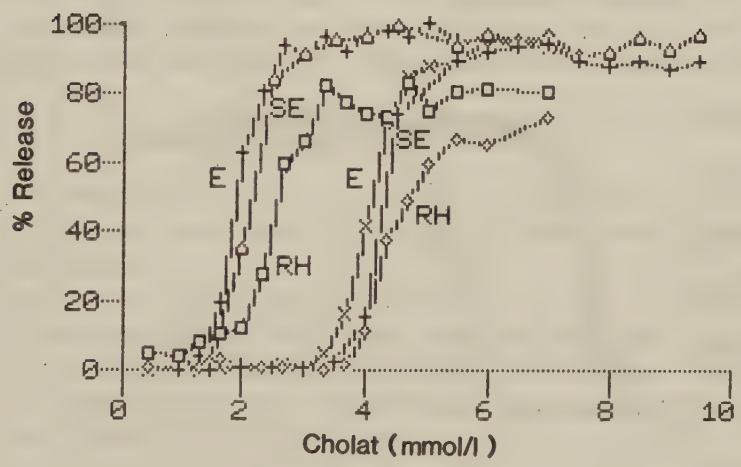


Abbildung 8 : Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von Liposomen mit 30%igem Eidotter (E)-, Schweineerytrozyten (SE)-, bzw. Rinderhirn (RH)-SM-Gehalt, die bei Zimmertemperatur mit C inkubiert wurden.

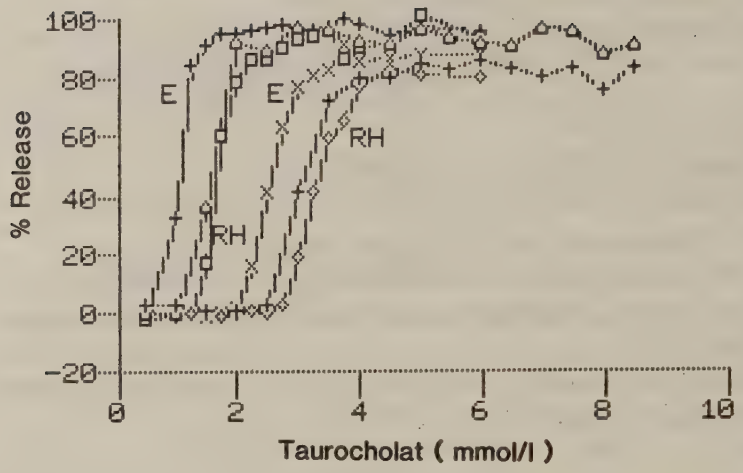


Abbildung 9 : Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von Liposomen mit 30%igem Eidotter (E)-, Schweineerythrozyten (SE)-, bzw. Rinderhirn (RH)-SM-Gehalt, die bei Zimmertemperatur mit TC inkubiert wurden.

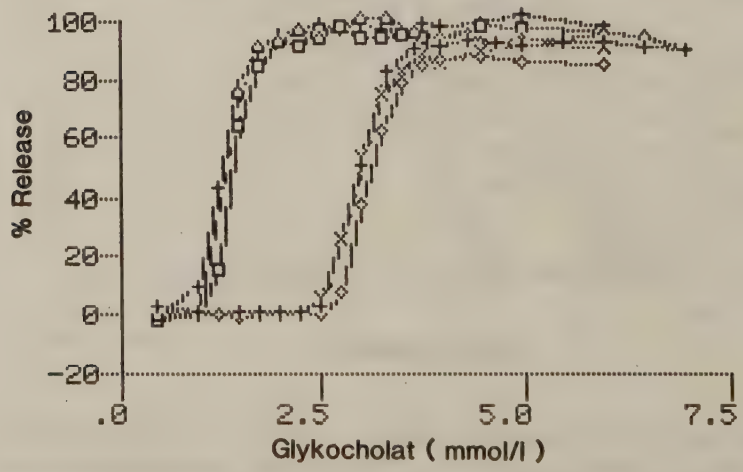


Abbildung 10: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von Liposomen mit 30%igem Eidotter-, Schweineerythrozyten-, bzw. Rinderhirn-SM-Gehalt, die bei Zimmertemperatur mit GC inkubiert wurden.

Somit ergibt sich für die durch Interpolation ermittelten Werte für einen 50%igen Release von ^{3}H-Inulin bzw. ^{14}C-Lecithin (s. Tab. 6):

Tabelle 6 : Gallensäurekonzentrationen (µmol/l), die eine 50%ige Permeabilisierung / eine 50%ige Solubilisierung von Liposomen mit angegebenem SM-Gehalt bewirken.

SM-Gehalt	C	TC	GC
0% = 100% Lecithin^{+}	3150/5300	2300/4100	2150/3700
30% RHSM	2550/4675	1700/3375	1425/3125
30% SESM	2150/4300	1600/3150	1350/3000
30% ESM	1900/4075	1100/2600	1300/3000
	1825/3950	1200/2900	1300/3100
	2000/4150		
30% ESM Durchschnitt	1900/4050	1150/2750	1300/3050

$^{+}$ Durchschnittswert aus eigenen und einer Vielzahl anderer in der Arbeitsgruppe bereits durchgeführter Versuche (52)

- Die verwendeten SM-Gemische bewirken also bei einem Membrananteil von 30% immer eine Destabilisierung der Liposomenmembran gegenüber Gallensäuren.
- Dieser Effekt zeigt sich am ausgeprägtesten beim ESM; nur in der GC-Resistenz differieren die untersuchten Sphingomyeline so gut wie nicht. ESM wurde deswegen für die weiteren Untersuchungen verwendet (zum anderen, weil darauf geachtet wurde Material aus der gleichen Quelle, hier Eidotter, zu verwenden).

3.1.2. Temperaturabhängigkeit der Membraneigenschaften

3.1.2.1. Temperaturabhängigkeit der Liposomenpräparation

Nach der Liposomenpräparation mußte das in der Pufferflüssigkeit verbliebene ^{3}H-Inulin von den Liposomen säulenchromatographisch getrennt werden. Photometrische Elutionsdiagramme wurden aufgezeichnet. Bis zu einem SM-Gehalt von 30% erschienen die bei Zimmertem-

peratur hergestellten Liposomen als einheitliche Population. Wurden 40ESM-Liposomen bei Zimmertemperatur angesetzt, ergab sich eine zweigipflige Elutionskurve (s. Abb. 11).

Schon bei der einfachen Betrachtung mit dem bloßen Auge fiel auf, daß die bei Zimmer-Temperatur (20 - 25°C) hergestellten 40% ESM enthaltenden Liposomen-Präparationen im Gegensatz zu denen mit niedrigerem SM-Anteil nicht mehr opaleszierend-durchsichtig waren, sondern getrübt-milchig erschienen. Außerdem fiel auf, daß sich diese Suspensionen nach einem Tag entmischten: Ein Teil des Substrats sedimentierte ab; der Überstand ergab wieder die übliche opaleszierende Transparenz. Nach heftigem Aufschütteln des Sediments erschien die Suspension wieder opaleszierend-tranparent; nach einem Tag war aber wieder die Entmischung festzustellen.

40ESM-Liposomen wurden aus teilweise ^{14}C-markiertem SM und aus teilweise ^{3}H-markiertem Lecithin hergestellt. Dabei stellt sich heraus, daß die im Überstand verbliebenen Liposomen dem ursprünglichen SM : Lecithin-Verhältnis von 40 : 60 entsprachen; für die sedimentierten Liposomen ergab sich aber ein leicht verändertes Verhältnis von 44 : 56.

Diese bei Zimmer-Temperatur präparierten 40ESM-Liposomen stellten sich auch als sehr viel größer als die aus allen anderen Präparationen heraus (vgl. dazu Kapitel 3.1.3.).

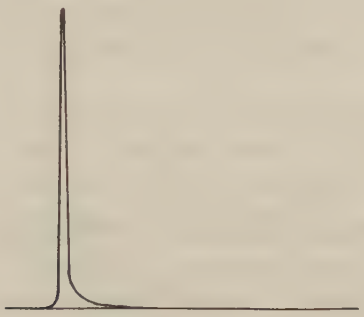
Um auszuschließen, daß dieses Phänomen auf eine Interaktion mit dem bei der Liposomen-Reinigung verwendeten Säulen-Material zurückzuführen gewesen wäre, wurden einige Präparationen nach der Dialyse mittels Filter vom verbliebenen ^{3}H-Inulin befreit. Diese Liposomen zeigten das gleiche optische Verhalten wie die säulenchromatographisch gereinigten. Analytische Säulenläufe mit Sepharose 2B-CL als Gel entsprachen denen der auf übliche Weise präparierten Liposomen. Präparationen mit einem anderen Dialysegerät, dem Mini-Lipoprep, verhielten sich auch nicht anders.

Unter der Annahme, daß dieses Phänomen dadurch verursacht wurde, daß unterhalb der Übergangstemperatur der Membran gearbeitet wurde, wurden die Liposomen mit 40% ESM-Gehalt bei 40°C und die Liposomen mit 50% und 65% ESM-Gehalt bei 53°C hergestellt. Diese Suspensionen zeigten wieder die gewünschte opaleszierende Transparenz. Die Elutionsdiagramme zeigten wieder nur einen einzigen peak (s. Abb. 11).

Abbildung 11: Schematische Darstellung der extinktions-photometrischen Elutionsdiagramme der Säulenläufe der Liposomen mit jeweils angegebenem SM-Gehalt

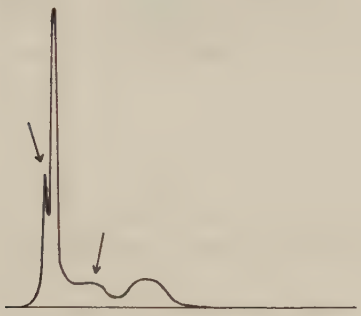
Liposomenpräparation bei Zimmertemperatur (20 - 25°C):

0 bis 30% SM:



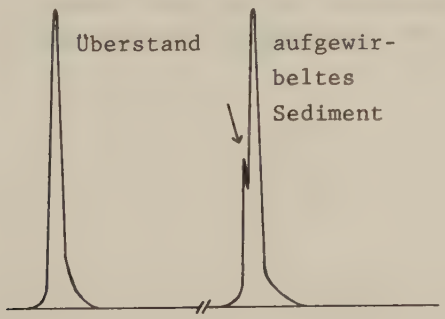
ein einziger schmaler Gipfel; mit zunehmendem SM-Gehalt leicht zunehmende Breite des Gipfels.

40% SM und mehr:



inkonstant auftretende Aufsplitterung des ersten Gipfels; hohe und breite Schulter nach dem ersten Gipfel.

Der Überstand und das aufgewirbelte Sediment von 40ESM-Liposomen wurden rechromatographiert:

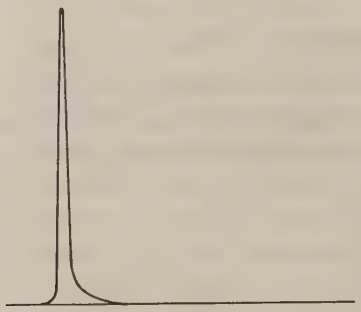


zwar geringfügige Verbreiterung und beim Sediment Aufsplitterung; dennoch nur ein einziger relativ schmaler Gipfel ohne Schulter.

Liposomenpräparation bei 53°C:

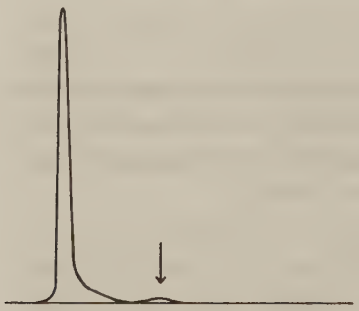
bis 65% SM:

wiederum ein einziger schmaler Gipfel



70 und 85% SM

Bei diesen sehr hohen SM-Gehalten blieb auf der Säule eine trübe Flüssigkeit liegen. Relativ geringfügige Verbreiterung des ersten Gipfels; Auftreten eines späten niedrigen Gipfels.



Ansätze mit 70% und 85% ESM ergaben trotz Präparation bei 53°C, d.h. weit über der Übergangstemperatur, große Inhomogenitäten; eine trübe Flüssikeit blieb bei den Säulenläufen auf den Säulen liegen (s. Abb. 11). Elektronenmikroskopische Beobachtungen sind dem Kapitel 3.1.4. zu entnehmen.

3.1.2.2. Temperaturabhängigkeit der Membranordnung

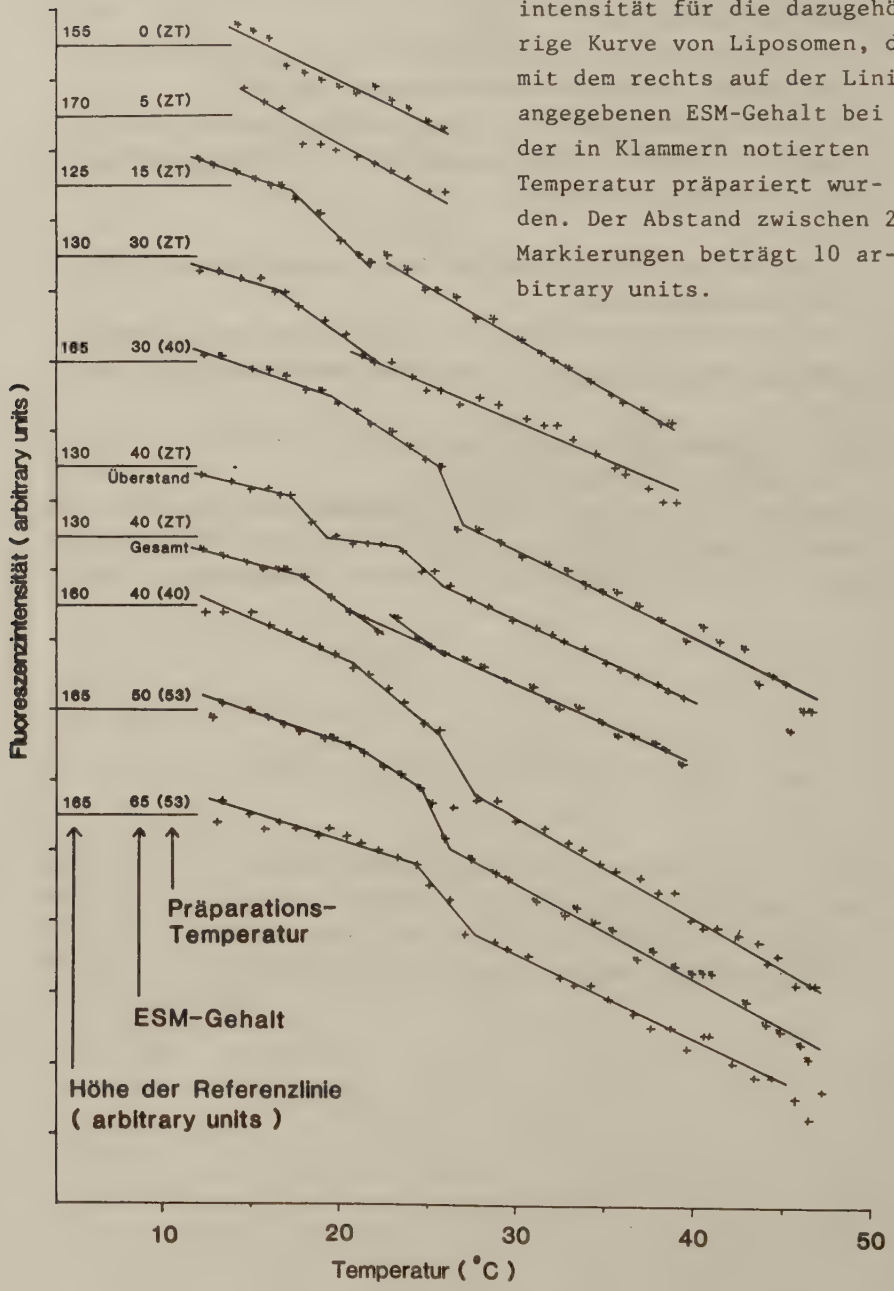
Vorversuche zur Messung der steady-state-Fluoreszenz-Anisotropie ergeben bei 18,8°C, daß

- die Membranordnung wie zu erwarten auch für die verwendeten Sphingomyeline mit steigendem SM-Gehalt zunimmmt, und daß
- die RH- und SE-Sphingomyeline bei gleichem Membrananteil (30%) eine höhere Membranrigidität bewirken als das im folgenden durchgehend verwendete E-Sphingomyelin.

- Zur Untersuchung des Einflusses des Gehalts des verwendeten ESM auf die Membranordnung,
- zur Verifizierung, daß nunmehr bei der Herstellung der Liposomen mit höherem ESM-Anteil oberhalb der Übergangstemperatur gearbeitet wurde, und
- zur Festlegung der Inkubationstemperaturen für die späteren Resistenzmessungen gegenüber Gallensäuren

wurde die Fluoreszenz-Anisotropie der Membran der verschiedenen Liposomen im Temperaturbereich von 15 bis 45°C untersucht. Es ergaben sich dabei die in den Abbildungen 12 , 13 und 14 wiedergegebenen Kurven.

Abbildung 12 : DPH-Fluoreszenzintensitäten. Die Referenzlinie markiert die Höhe der links auf ihr verzeichneten Fluoreszenzintensität für die dazugehörige Kurve von Liposomen, die mit dem rechts auf der Linie angegebenen ESM-Gehalt bei der in Klammern notierten Temperatur präpariert wurden. Der Abstand zwischen 2 Markierungen beträgt 10 arbitrary units.



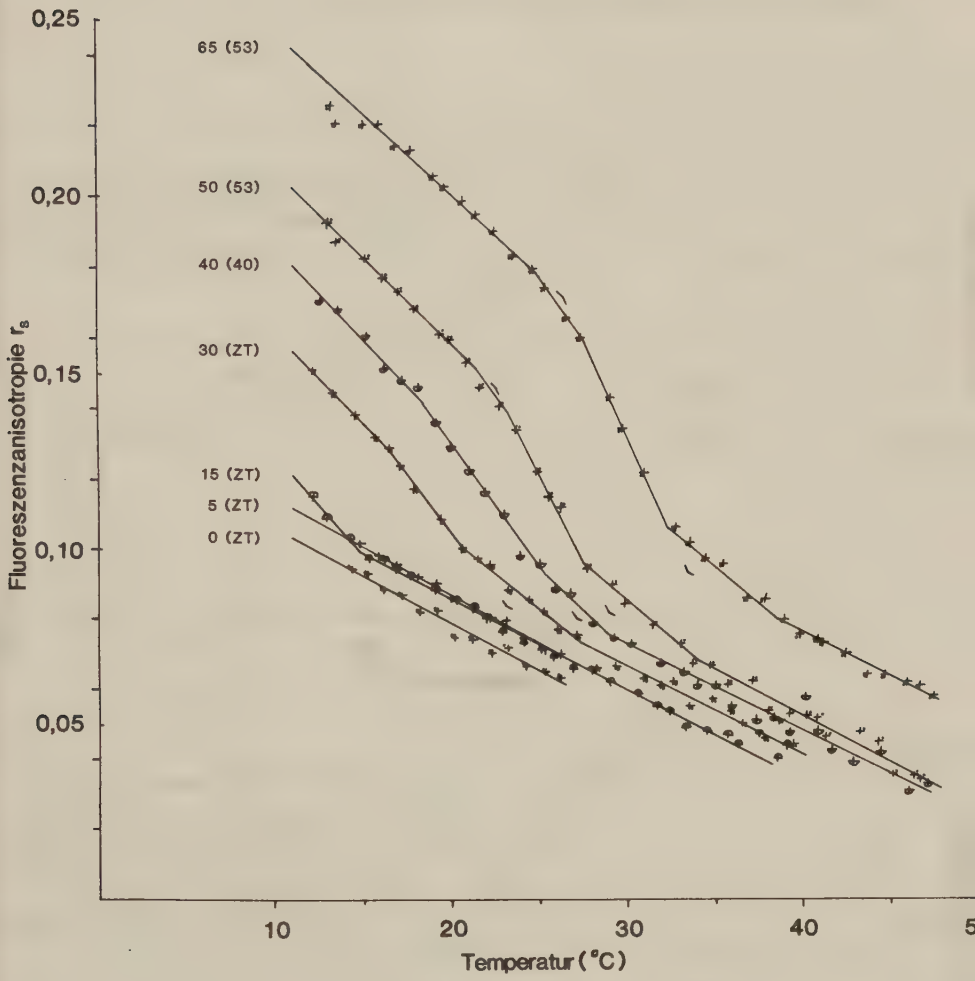
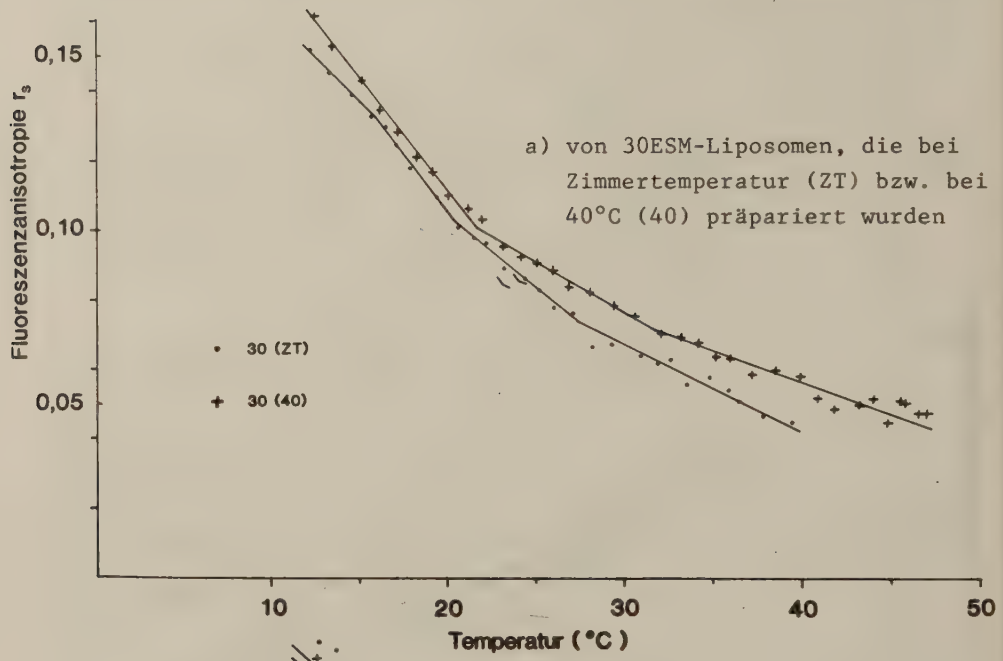
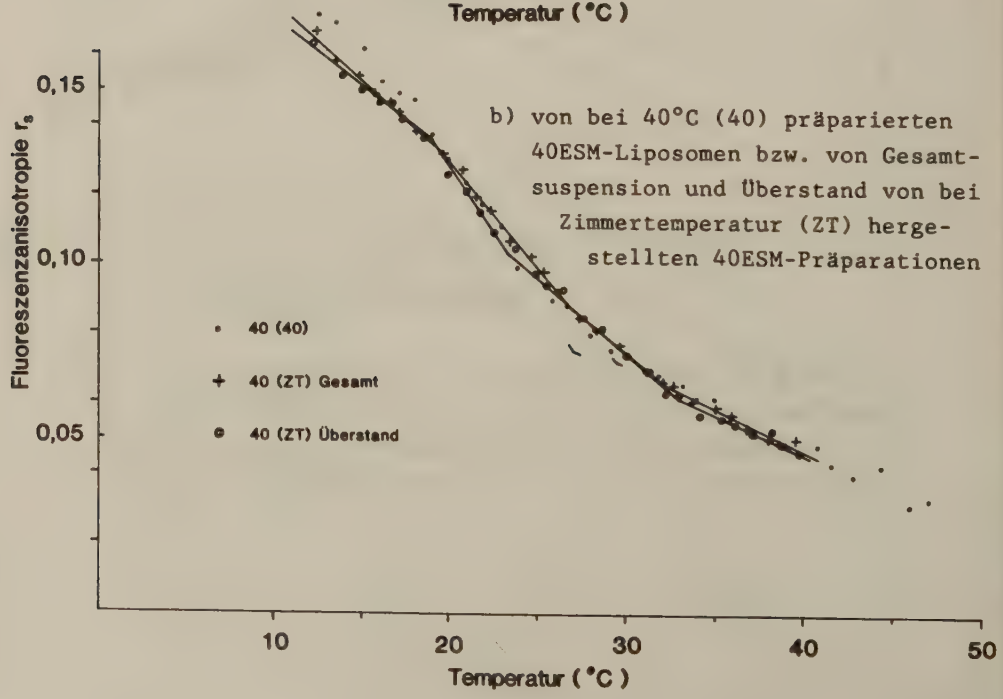


Abbildung 13 : DPH-Fluoreszenzanisotropie-Kurven von 0-30ESM-Liposomen (bei Zimmertemperatur (ZT) präpariert), von 40-ESM-Liposomen (bei 40°C (40) präpariert) und von 50- und 65ESM-Liposomen (bei 53°C (53) präpariert)

Abbildung 14: Vergleich der DPH-Fluoreszenzanisotropie-Kurven



a) von 30ESM-Liposomen, die bei Zimmertemperatur (ZT) bzw. bei 40°C (40) präpariert wurden



b) von bei 40°C (40) präparierten 40ESM-Liposomen bzw. von Gesamtsuspension und Überstand von bei Zimmertemperatur (ZT) hergestellten 40ESM-Präparationen

Aus ihnen wurde graphisch der Bereich des Phasenübergangs ermittelt:

Tabelle 7 : DPH-fluoreszenzphotometrisch bestimmte Phasenübergangs-bereiche der Liposomenmembranen. Als untere bzw. obere Grenze (Angaben in °C) wurde der Schnittpunkt der Geraden durch den linearen Bereich des Phasenübergangs mit der Geraden durch den linearen Bereich des Gel- bzw. flüssigkristallinen Zustands bestimmt. ZT = Zimmertemperatur = 20 - 25°C.

Liposomen	Präparations-temperatur	mit Fluoreszenz-intensität bestimmte		mit Fluoreszenz-anisotropie bestimmte	
		untere	obere	untere	obere Grenze
0ESM	ZT	-	-	-	-
5ESM	ZT	-	-	-	-
15ESM	ZT	17	20	-	15
30ESM	ZT	17	23	16	23
30ESM	40°C	25	27	-	24
40ESM	ZT				
Gesamtsuspension		18	26	17	29
Überstand		17	27	17	29
40ESM	40°C	23	28	18	28
50ESM	53°C	23	28	23	29
65ESM	53°C	24	29	27	34

- Wie zu erwarten nehmen mit steigendem ESM-Gehalt Ordnungsparameter und Übergangstemperaturen zu.
- Die Messungen belegen, daß für die Hauptversuche nunmehr oberhalb der Übergangstemperaturen präpariert wurde.
- Die Ordnungsparameter für Überstand und aufgewirbelte Gesamtsuspension von bei Zimmer-Temperatur präparierten 40ESM-Liposomen entsprechen sich. Es zeigt sich bei der Betrachtung der Fluoreszenzintensitäten ein angedeutet mehrstufiger Phasenübergang. Die Werte für 30- bzw. 40ESM-Liposomen, die bei Zimmer-Temperatur präpariert wurden, differieren nur unwesentlich von den Werten für die Liposo-

men gleichen SM-Gehalts, die bei 40°C präpariert wurden.

- Um einerseits möglichst im gleichen Temperaturbereich, andererseits aber oberhalb der Übergangstemperatur zu inkubieren, wurden die Inkubationstemperaturen für die 0-40ESM-Liposomen auf 20 -25°C, die für die 50ESM-Liposomen auf 35 - 40°C und für die 65ESM-Liposomen auf 40 - 45°C festgelegt. Man nahm dabei in Kauf, daß die 40ESM-Liposomen im Bereich ihres Phasenübergangs inkubiert wurden, damit auch für diesen Sonderfall Werte vorlagen.

3.1.3. Größenbestimmung der Liposomen

Mit dem Nanosizer der Firma Coulter wurden die verschiedenen Liposomen-Präparationen mittels Laser-Autokorrelations-Spektroskopie bei Zimmertemperatur untersucht. Es ergab sich dabei die in Tabelle 8 wiedergegebene Größenverteilung.

Tabelle 8 : Laser-Autokorrelationsspektroskopische Größenbestimmung der Liposomen über 4 min bei Zimmertemperatur. In Klammern ist die Polydispersität angegeben. ZT = Zimmertemperatur = 20 - 25°C.

Liposomen	Präparations-temperatur	Größe (nm) Einzelmessungen verschiedener Präparationen	Durchschnitt
0ESM	ZT	71 (2), 77 (3)	74
5ESM	ZT	78 (2), 79 (3), 81 (4)	79
15ESM	ZT	83 (2), 86 (2), 92 (3)	87
30ESM	ZT	102 (2), 111 (2), 97 (1), 111 (3)	105
30ESM	40°C	71 (3)	71
40ESM	ZT		
Gesamtsuspension		181 (2), 175 (3)	178
Überstand		174 (2)	174
40ESM	40°C	76 (2)	76
50ESM	53°C	86 (3)	86
65ESM	53°C	118 (2)	118
30RHSM	ZT	83 (3)	83
30SESM	ZT	79 (3)	79

Es läßt sich also zusammenfassen:

- Mit zunehmendem SM-Gehalt ergaben sich immer größere Liposomen.
- Bei höheren Temperaturen hergestellte Liposomen sind kleiner.
- Liposomen, die zu 30% aus RHSM bzw. SESM bestehen, sind kleiner als solche mit 30%igem ESM-Gehalt.
- Bei 20 - 25°C angesetzte 40ESM-Präparationen ergeben wesentlich größere Vesikel, deren Durchmesser in der aufgewirbelten Gesamt-Suspension und im Überstand nur unwesentlich differieren.

3.1.4. Elekronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden Präparationen mit sehr hohem ESM-Gehalt (70 und 85%) verwendet, die - selbst bei 53°C hergestellt - sehr inhomogen waren. So blieb von diesen Suspensionen bei den analytischen Säulenläufen ein Rest trüber Flüssigkeit auf der Säule liegen. Das Sediment dieser Präparationen wurde von Zimmer-Temperatur (20 -25°C) aus für die Gefrierbruchmethode gefroren.

1) Größe

Die untersuchten Partikel erreichen Größen von mehreren Mikrometern; der größte erfaßbare Durchmesser ist 4 µm (s. Abb. 15d).Diese großen Partikel koexistieren mit kleinen, wohl unilamellaren Liposomen von Durchmessern zwischen 100 und 200 nm. Dazwischen gibt es Partikel aller Größen (s. Abb. 15a). Auf mehreren Aufnahmen wurden eng beieinanderliegende Vesikel gesehen, die Aggregate zu bilden oder zu fusionieren schienen (s. Abb. 15i).

2) Form

Die Membran der großen Partikel erscheint nicht nur von außen (s. Abb. 15c , d), sondern gelegentlich auch von innen (s. Abb. 15b) eingedellt. Diese Eindellungen erschienen wie Eindrücke kleinerer Liposomen.

3) Membranstruktur

a) Die großen Partikel sind multilamellarer Struktur. Bis zu 10 Bilayer-Schichten lassen sich in einzelnen Aufnahmen differenzieren. Da oft noch ein weiterer Stapel nicht im einzelnen zu differenzierender Schichten darauf gepackt zu erkennen ist, dürfte die wahre Anzahl der Schichten bei weit über 10 liegen (s. Abb. 15c und d).

b) Auf allen mit großen Vergrößerungen untersuchten Membranabschnitten läßt sich eine wellige Struktur - sogenannte "ripples" - erkennen.

Dies gilt auch für sehr kleine, wohl unilamellare Liposomen. Diese Wellen liegen parallel nebeneinander und bilden Längslinien oder Wirbel. Nur an sehr wenigen kleinen Stellen erscheint diese Struktur aufgehoben.

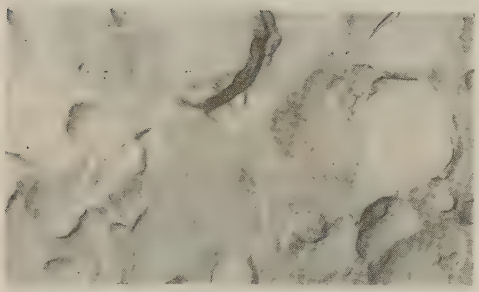
Deutlich zu erkennen ist, daß diese Wellenstruktur alle Bilayer-Schichten der multilamellaren Liposomen gleichförmig erfaßt und zwar so, daß alle aneinanderliegenden Bilayer-Schichten ein kongruentes "ripple"-Muster aufweisen.

Die Breite eines "ripple" beträgt bei den 70ESM-Präparationen (s.Abb. 15 c , d , e und f) ziemlich einheitlich 100 A (95 - 105 A). Die Breite der "ripples" auf den vorliegenden Aufnahmen der 85ESM-Präparationen (s. Abb. 15g und h) variiert stärker: 90 - 170 A. Daneben läßt sich auf einer dieser Aufnahmen neben den schmalen "ripples" eine ähnliche, aber wesentlch gröbere Wellenstruktur erkennen. Die Breite einer Aufwerfung beträgt hier ca. 310 A.

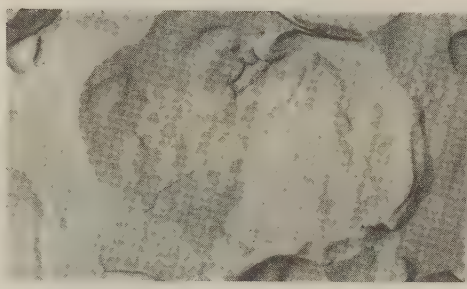
c) Auf einer Aufnahme der 70ESM-Präparation ließen sich runde Membraneinschlüsse einer Größe von ca. 15 - 30 nm erkennen, um die die "ripple"-Struktur der Membran aufgelöst erscheint (s. Abb. 15j).

Abbildung 15 : Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 70ESM-Präparationen (c , d , e , f , i und j) und 85ESM-Präparationen (a , b , g und h). Die Länge der Linie ⊢——⊣ entspricht auf der Aufnahme a 2 Mikrometern, auf der Aufnahme d 0,8 Mikrometern und auf den Aufnahmen b , c , e , f , g , h , i und j 0,5 Mikrometern.

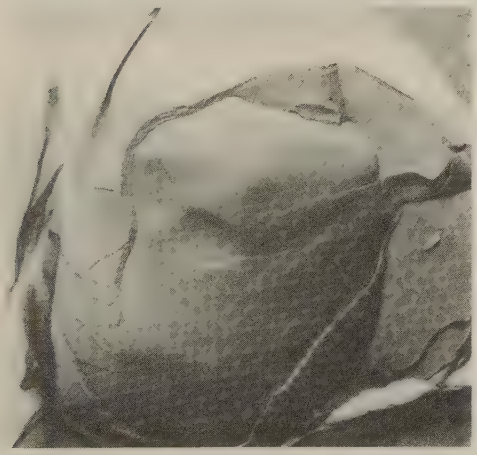
a)



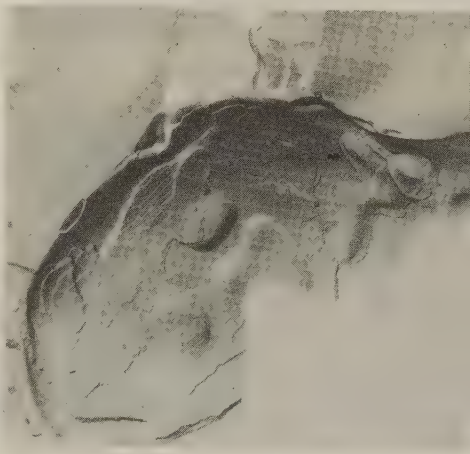
b)



c)

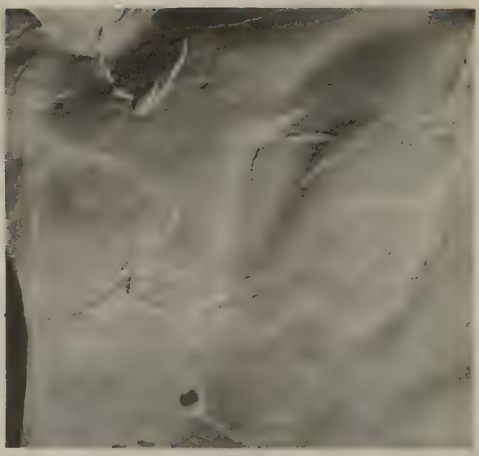


d)

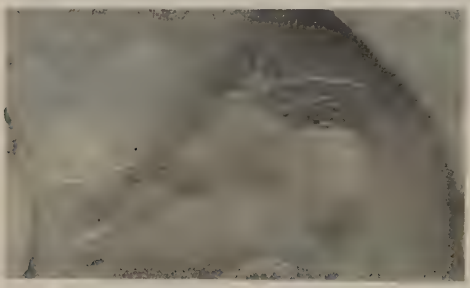


e)

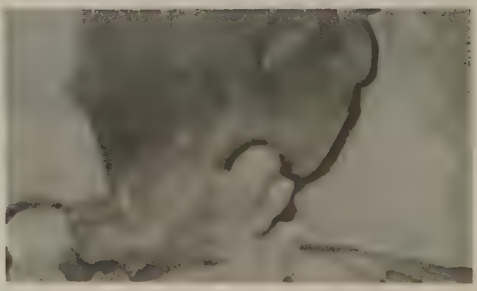
f)



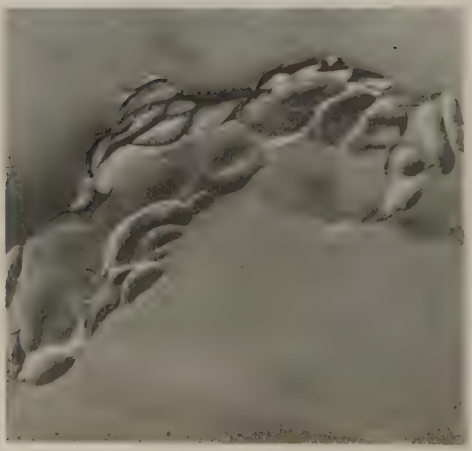
g)



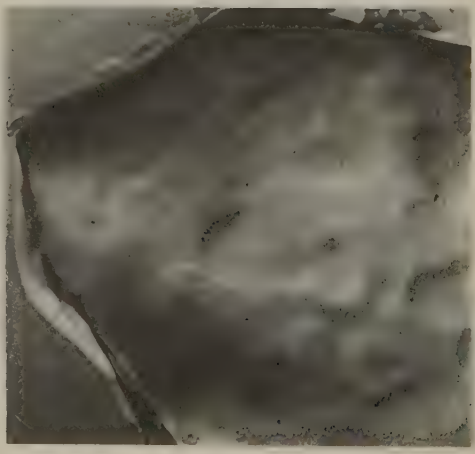
h)



i)



j)



3.1.5. ^{31}P-NMR-Analyse

Um auszuschließen, daß die multilamellaren Vesikel, die den Hauptteil der 70- und 85ESM-Präparationen ausmachten, aus hexagonalen Strukturen aufgebaut gewesen wären, wurde eine ^{31}P-NMR-Studie durchgeführt. Sie ergab - bei 25°C durchgeführt - ein für eine lamellare Struktur typisches Signal (54). (s. Abb. 16)

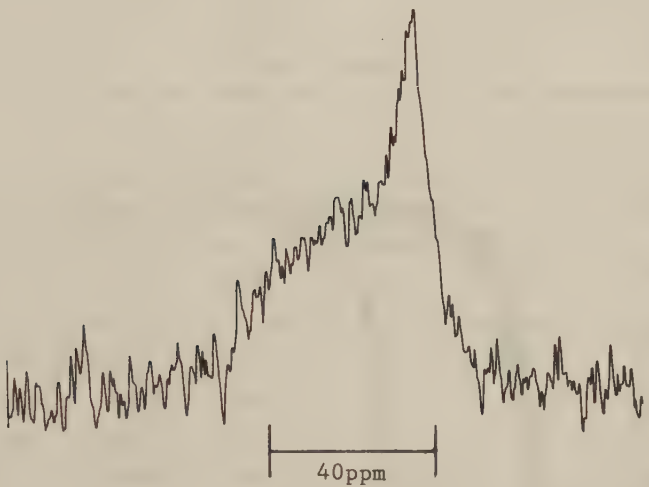


Abbildung 16 : ^{31}P-NMR-Signal von bei 53°C hergestellten 85ESM-Liposomen aufgenommen mit einem Bruker SXP4-100-Spectrometer mit Breitbandentkopplung; ^{31}P-Frequenz von 31,4 MHz; 7000 scans bei 1 scan/sec; 25°C. Die Analyse wurde freundlicherweise von K. Beyer und R. Schubert zur Verfügung gestellt.

3.2. Bestimmung der Gallensäure-Resistenz der Liposomen

3.2.1. Verdünnungsreihen

Zur Klärung der Frage, ob der Angriff der Gallensäuren auf die Liposomenmembranen auch wesentlich von der Konzentration der Liposomen-Suspension abhängt, wurden verschiedene Verdünnungen der Standard-Suspension (Extrembereich: 5 - 8 mmol Lipid / l) mit Gallensäuren inkubiert. Die Standard-Suspension wurde gewonnen, indem die der Trennungssäule entnommenen Ursuspension sofort 1 : 4 verdünnt wurde. Alle Verdünnungen wurden mit dem universell verwendeten Puffer (siehe 2.1.) hergestellt. Diese Inkubationsversuche ergaben folgende Kurven (s. Abb. 17 und 18):

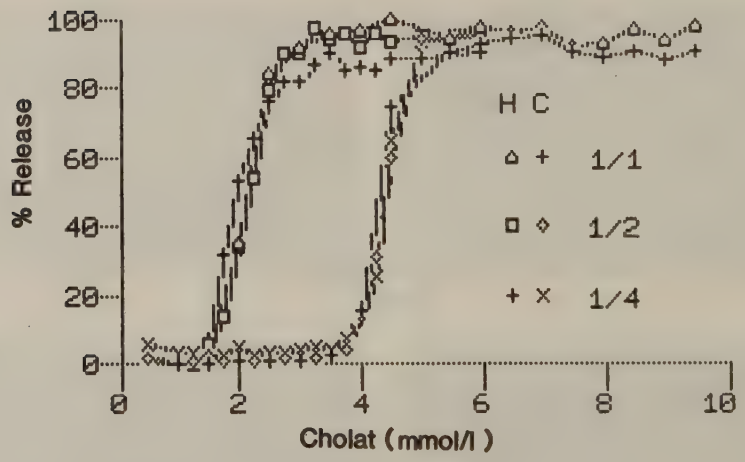


Abbildung 17: Permeabilisierung (linke Kurven, H) und Solubilisierung (rechte Kurven, C) von 30SESM-Liposomen einer Präparation, von der Fraktionen nicht bzw. 1:2 bzw. 1:4 mit Phosphatpuffer verdünnt und dann mit C inkubiert wurden.

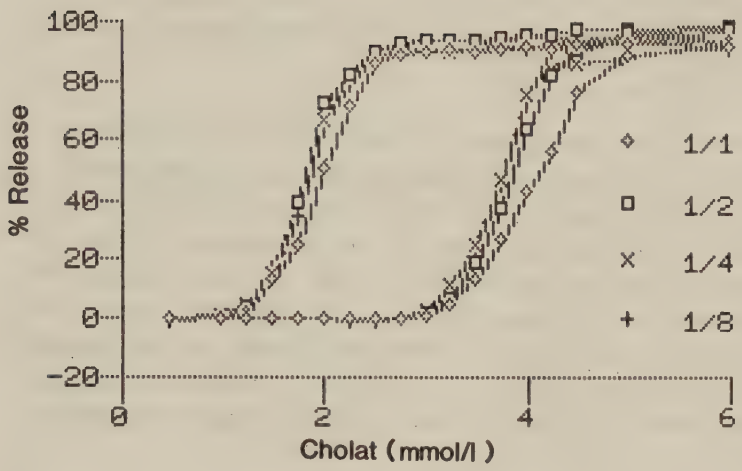


Abbildung 18 : Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 30ESM-Liposomen einer Präparation, von der Fraktionen nicht bzw. 1:2 bzw. 1:4 bzw. 1:8 mit Phosphatpuffer verdünnt und dann mit C inkubiert wurden.

Dies ergibt für die interpolierten 50%-Werte von Permeabilisierung und Solubilisierung (s. Tab. 9):

Tabelle 9 : Cholatkonzentrationen (µmol/l), die bei 20 - 25°C eine 50%ige Permeabilisierung / eine 50%ige Solubilisierung von Liposomen bei angegebener Verdünnung bewirken.

Liposomen	Verdünnung	Cholat
30SESM	1	2150 / 4300
30SESM	1/2	2200 / 4400
30SESM	1/4	2200 / 4400
30ESM	1	2000 / 4125
30ESM	1/2	1825 / 3875
30ESM	1/4	1850 / 3775
30ESM	1/8	1875 / 3775

Die Freisetzung von Inulin und Lecithin aus den Liposomen wird also durch verschiedene Mengen angebotenen Liposomen-Lipids nur unwesentlich beeinflußt.

3.2.2. Verhältnis von Sphingomyelin und Lecithin bei der Emulgierung

Um zu klären, ob SM und Lecithin bei gleichen Gallensäure-Konzentrationen im gleichen Maße aus der Membran emulgiert werden, und ob es infolgedessen gestattet ist, sich auf die Markierung nur eines der beiden Membranlipide zu beschränken, wurden in einem Versuch mit 40ESM-Liposomen, die allerdings noch bei Zimmer-Temperatur paräpariert wurden und so einen Sonderfall darstellen, sowohl das Sphingomyelin (^{14}C) als auch das Lecithin (^{3}H) markiert. Nach Cholat-Inkubation zeigte sich das in Tabelle 10 und 11 wiedergegebene Emulsionsverhalten:

Tabelle 10 : Emulgierung von ^{3}H-Lecithin bzw. ^{14}C-Sphingomyelin durch Cholat-Inkubation (20 - 25°C) des 1:4 mit Phosphatpuffer verdünnten Überstands einer bei Zimmertemperatur hergestellten 40ESM-Präparation.

Cholatkonzentration (µmol/l)	Lecithin-Release (%)	Sphingomyelin-Release (%)
1000	0,5	0,5
2000	1,1	0,9
2500	2,8	2,7
2750	10,6	14,4
3000	18,7	23,4
3250	33,3	39,2
3500	50,1	54,3
4000	72,3	75,4
5000	84,6	84,8

Tabelle 11 : Emulgierung von ^{3}H-Lecithin bzw. ^{14}C-Sphingomyelin durch Cholat-Inkubation (20 - 25°C) des 1:10 mit Phosphatpuffer verdünnten Sediments einer bei Zimmertemperatur hergestellten 40ESM-Präparation.

Cholatkonzentration (µmol/l)	Lecithin-Release (%)	Sphingomyelin-Release (%)
1000	0	0
2000	0,8	0,4
2500	8,6	9,8
2750	34,7	41,0
3000	47,8	55,2
3250	57,8	63,2
3500	68,8	75,7
4000	87,0	84,8
5000	84,8	89,4

Es zeigt sich also, daß SM nur sehr geringfügig früher emulgiert wird als Lecithin, daß das Verhalten beider Lipide sich über den ganzen Gallensäure-Konzentrations-Bereich fast exakt gleicht, und daß dies für die beiden untersuchten recht verschiedenartigen Liposomen-Populationen gilt. Man kann sich folglich zur Beobachtung der Emulsion auf die Markierung eines der Lipide beschränken. Es wurde im folgenden ^{14}C-Lecithin als markiertes Lipid verwendet, da Lecithin bei fast allen Präparationen den größten Membrananteil ausmacht und markiertes Lecithin günstiger zu beschaffen war.

3.2.3. Gallensäure-Resistenz der Liposomenmembranen in Abhängigkeit von ihrem Sphingomyelin-Gehalt und der Inkubationstemperatur

Als Gallensäuren wurden die physiologischen Trihydroxy-Gallensäuren Cholat, Taurocholat und Glykocholat gewählt, da sie etwa die Hälfte des Pools primärer Gallensäuren beim Menschen ausmachen, und zum anderen, weil sie im Gegensatz zu den Dihydroxy-Gallensäuren erst bei relativ hohen Konzentrationen membranschädigend wirken und somit Konzentrationsunterschiede für gleiche Membranschädigungen in absoluten Zahlen ausgedrückt stärker in Erscheinung treten.

Für diese Versuche wurden für Liposomen mit gleichem SM-Gehalt jeweils zwei verschiedene Liposomen-Präparationen mit jeweils neu angesetzten Gallensäure-Lösungen inkubiert. Die Inkubationen wurden für 0-40ESM-Liposomen bei 20 - 25°C, für 50ESM-Liposomen zusätzlich bei 35 - 40°C und für 65ESM-Liposomen zusätzlich bei 40 - 45°C durchgeführt. Reine Lecithin-Liposomen wurden zu Vergleichszwecken sowohl bei 20 - 25°C als auch bei 40 - 45°C inkubiert.

Die Kurven mit allen Einzelergebnissen dieser Versuche sind im Anhang abgebildet. Zur besseren Übersicht seien hier nunmehr nur die interpolierten Werte für den 50%igen Release von ^{3}H-Inulin bzw. ^{14}C-Lecithin aufgelistet (s. Tab. 12).

Tabelle 12: Gallensäurekonzentrationen, die eine 50%ige Permeabilisierung / eine 50%ige Solubilisierung von Liposomen mit angegebenem SM-Gehalt bei der angegebenen Inkubationstemperatur bewirken. Unter dem Querstrich steht jeweils das arithmetische Mittel der Werte der Einzelversuche. Die Temperatur, bei der die jeweiligen Liposomen präpariert wurden, ist in Klammern angegeben. ZT = Zimmertemperatur = 20 - 25°C.

Liposomen	Inkubationstemperatur (°C)	C (µmol/l)	TC (µmol/l)	GC (µmol/l)
0ESM (ZT)	20-25	2900/5250	2100/4400	2200/3800
			2900/5600	
	+	3150/5300	2300/4100	2150/3700
0ESM (ZT)	40-45	2600/5650	3400/6400	2900/8000
		3150/5800	3100/6900	4450/ca.9000
		2875/5725	3250/6650	3675/8500
5ESM (ZT)	20-25	2650/4900	2100/3800	2000/3650
		2600/4750	2000/3400	2100/3650
		2625/4825	2050/3600	2050/3650
15ESM (ZT)	20-25	2300/4300	1600/3200	1700/3300
		2300/4600	1600/3300	1750/3500
		2300/4450	1600/3250	1725/3400
30ESM (ZT)	20-25	1900/4075	1100/2600	1300/3000
		1825/3950	1200/2900	1300/3100
		2000/4125		
		1900/4050	1150/2750	1300/3050
40ESM (ZT)	20-25			
Gesamtsuspension		900/3125	750/3275	400/2550
Überstand		1200/3300	900/3550	1000/2750
		1500/3550	900/2700	
Sediment		1000/3050		

+ Durchschnittswert aus eigenen und einer Vielzahl anderer in der Arbeitsgruppe bereits durchgeführter Versuche (52)

Liposomen	Inkubations-temperatur (°C)	C (µmol/l)	TC (µmol/l)	GC (µmol/l)
40ESM (40°C)	20-25	700/3650	1300/4400	1050/3700
		1000/3500	500/3050	1350/4850
			800/3500	
		850/3575	875/3650	1200/4275
50ESM (53°C)	20-25	700/3600	350/2400	550/2900
		800/3450	400/2700	450/2600
		750/3525	375/2550	500/2750
50ESM (53°C)	35-40	1200/3600	800/3000	800/3100
		1300/3750	700/3000	750/3150
		1250/3675	800/3000	775/3125
65ESM (53°C)	20-25	675/3300	600/3900	350/2700
		850/3500	400/3000	550/3000
		700/3400	500/3450	450/2850
65ESM (53°C)	40-45	825/3900	425/3000	1050/3350
		1100/3800	1500/4400	1100/3500
			950/3200	
		950/3850	950/3550	1075/3425

Es fällt auf, daß die Einzelergebnisse v.a. für 40ESM-Liposomen und für die bei 40 - 45°C inkubierten 0- und 65-ESM-Liposomen stark divergieren (nicht aber die für bei 35 - 40°C inkubierte 50ESM-Liposomen).
Diese Ergebnisse lassen sich auch graphisch in Abhängigkeit vom SM-Gehalt der Liposomenmembranen darstellen - in absoluten Zahlen (s. Abb. 19 , 20 und 21) oder aber im Vergleich zu den Werten für reine Lecithin-Liposomen (s. Abb. 22 , 23 und 24).

Abbildung 19 : Cholat-Resistenz von Liposomen mit verschiedenem SM-Gehalt. Durchschnittswerte der Cholat-Konzentrationen, die eine 50%ige Permeabilisierung (untere Kurve) bzw. eine 50%ige Solubilisierung (obere Kurve) bewirken, in Abhängigkeit vom SM-Gehalt der damit inkubierten Liposomen. Die Werte für reine Lecithin-Liposomen sind zum besseren Vergleich als horizontale Linien angegeben. Wurde in einem anderen Temperaturbereich als 20-25°C inkubiert, sind die jeweiligen Inkubationstemperaturen im Graphen angegeben (20 = 20-25°C, 35 = 35-40°C, (35) = interpolierter Wert für 35-40°C, 40 = 40-45°C). Durchgezogene Linie = Inkubation oberhalb der Übergangstemperatur, gepunktete Linie = Inkubation innerhalb oder unterhalb des Phasenübergangs.

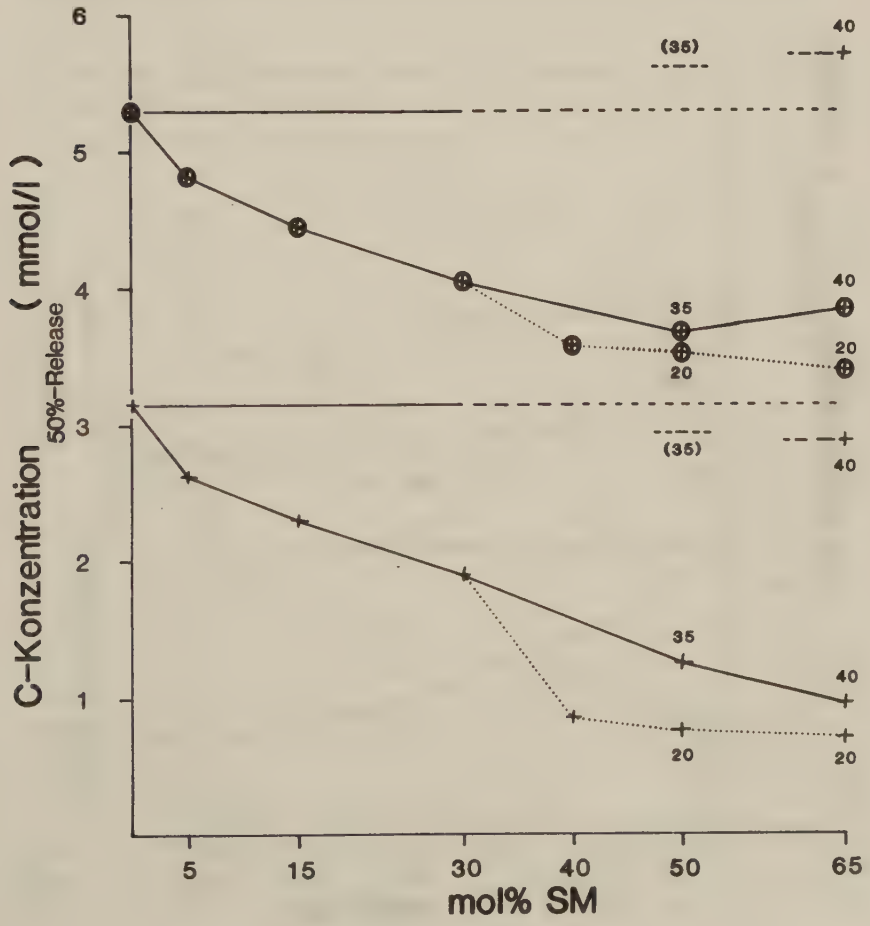


Abbildung 20 : Taurocholat-Resistenz von Liposomen mit verschiedenem SM-Gehalt. Durchschnittswerte der Taurocholat-Konzentrationen, die eine 50%ige Permeabilisierung (untere Kurve) bzw. eine 50%ige Solubilisierung (obere Kurve) bewirken, in Abhängigkeit vom SM-Gehalt der damit inkubierten Liposomen. Die Werte für reine Lecithin-Liposomen sind zum besseren Vergleich als horizontale Linien angegeben. Wurde in einem anderen Temperaturbereich als 20-25°C inkubiert, sind die jeweiligen Inkubationstemperaturen im Graphen angegeben (20 = 20-25°C, 35 = 35-40°C, (35) = interpolierter Wert für 35-40°C, 40 = 40-45°C). Durchgezogene Linie = Inkubation oberhalb der Übergangstemperatur, gepunktete Linie = Inkubation innerhalb oder unterhalb des Phasenübergangs.

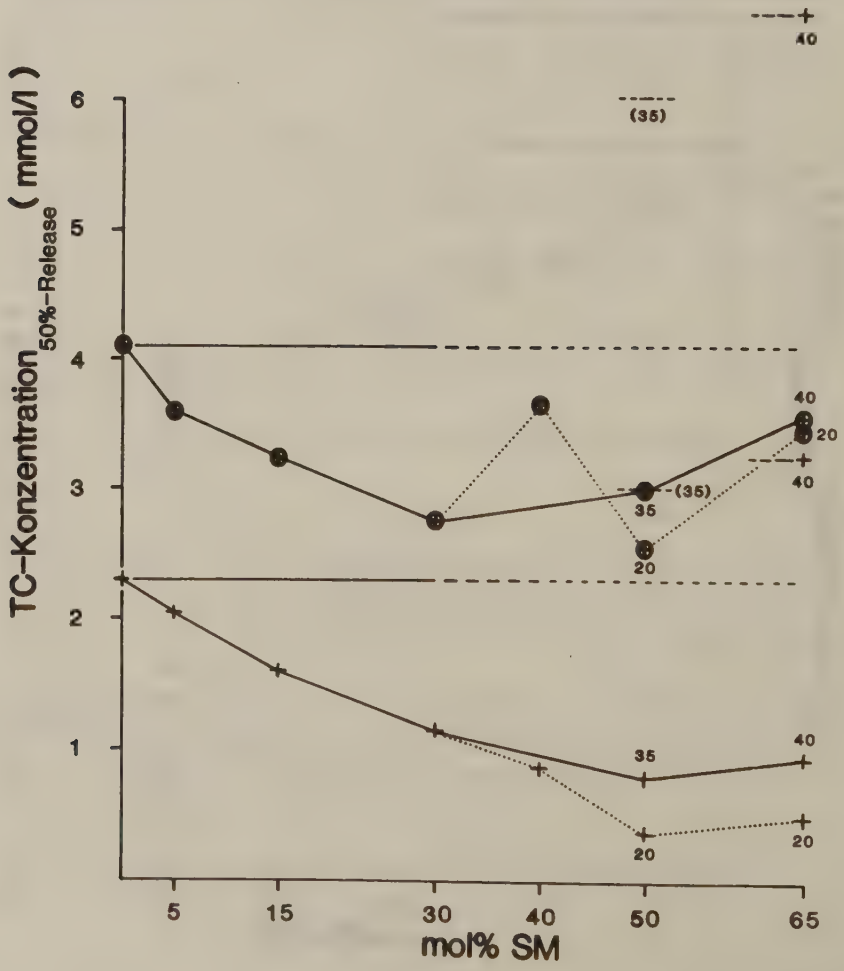


Abbildung 21 : Glykocholat-Resistenz von Liposomen mit verschiedenem SM-Gehalt. Durchschnittswerte der Glykocholat-Konzentrationen, die eine 50%ige Permeabilisierung (untere Kurve) bzw. eine 50%ige Solubilisierung (obere Kurve) bewirken, in Abhängigkeit vom SM-Gehalt der damit inkubierten Liposomen. Die Werte für reine Lecithin-Liposomen sind zum besseren Vergleich als horizontale Linien angegeben. Wurde in einem anderen Temperaturbereich als 20-25°C inkubiert, sind die jeweiligen Inkubationstemperaturen im Graphen angegeben (20 = 20-25°C, 35 = 35-40°C, (35) = interpolierter Wert für 35-40°C, 40 = 40-45°C). Durchgezogene Linie = Inkubation oberhalb der Übergangstemperatur, gepunktete Linie = Inkubation innerhalb oder unterhalb des Phasenübergangs.

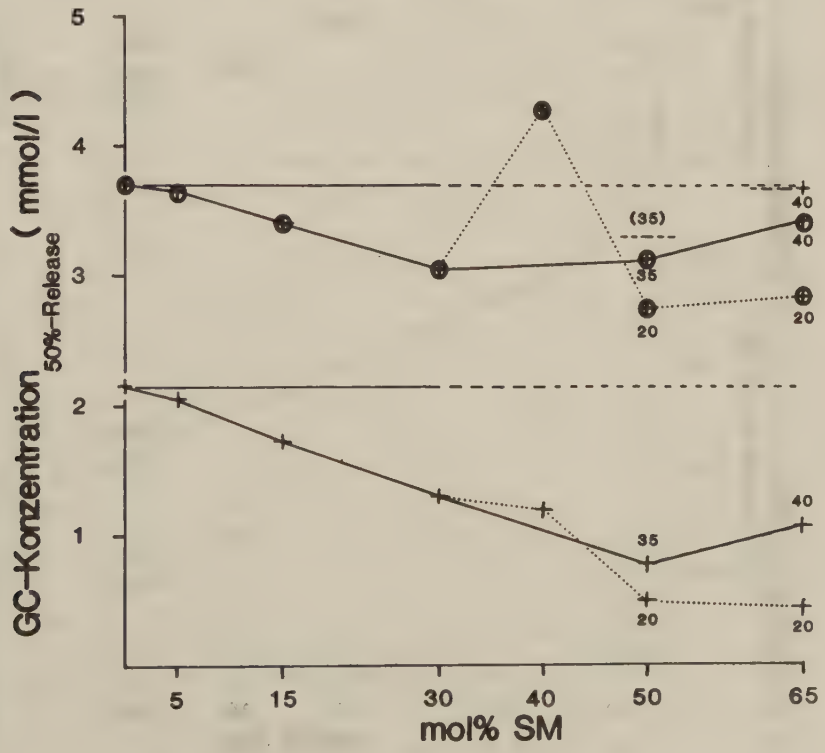


Abbildung 22 : Relative Cholat-Resistenz von Liposomen mit verschiedenem SM-Gehalt im Vergleich zu reinen Lecithin-Liposomen. Quotient aus Durchschnitt der Cholat-Konzentrationen, die bei einem gegebenem SM-Gehalt der Membranen zu einer 50%-igen Permeabilisierung (obere Kurve) bzw. zu einer 50%igen Solubilisierung (untere Kurve) führen, und durchschnittlicher Cholat-Konzentration, die den entsprechenden 50%igen Release aus reinen Lecithin-Liposomen bewirkt. Wurde auch in anderen Temperaturbereichen als 20-25°C inkubiert, sind die jeweiligen Inkubationstemperaturen im Graphen angegeben (20 = 20-25°C, 35 = 35-40°C, (35) = interpolierter Wert für 35-40°C, 40 = 40-45°C). Durchgezogene Linie = Inkubation oberhalb der Übergangstemperatur, gepunktete Linie = Inkubation innerhalb oder unterhalb des Phasenübergangs.

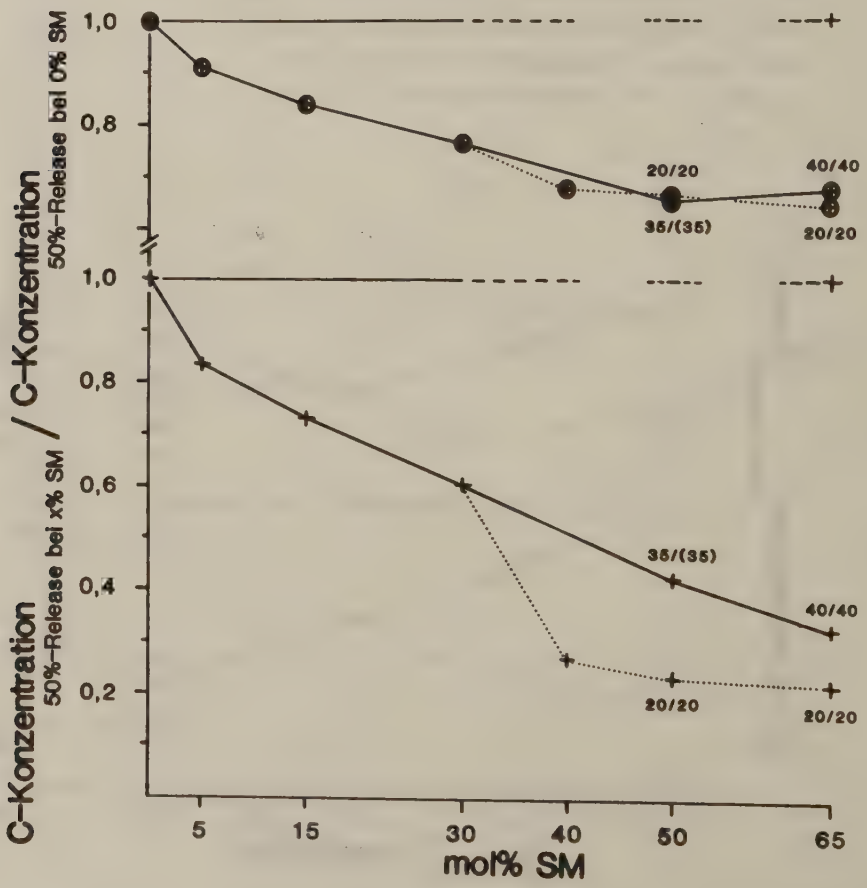


Abbildung 23 : Relative Taurocholat-Resistenz von Liposomen mit verschiedenem SM-Gehalt im Vergleich zu reinen Lecithin-Liposomen. Quotient aus Durchschnitt der Taurocholat-Konzentrationen, die bei einem gegebenem SM-Gehalt der Membranen zu einer 50%igen Permeabilisierung (obere Kurve) bzw. zu einer 50%igen Solubilisierung (untere Kurve) führen, und durchschnittlicher Taurocholat-Konzentration, die den entsprechenden 50%igen Release aus reinen Lecithin-Liposomen bewirkt. Wurde auch in anderen Temperaturbereichen als 20-25°C inkubiert, sind die jeweiligen Inkubationstemperaturen im Graphen angegeben (20 = 20-25°C, 35 = 35-40°C, (35) = interpolierter Wert für 35-40°C, 40 = 40-45°C). Durchgezogene Linie = Inkubation oberhalb der Übergangstemperatur, gepunktete Linie = Inkubation innerhalb oder unterhalb des Phasenübergangs.

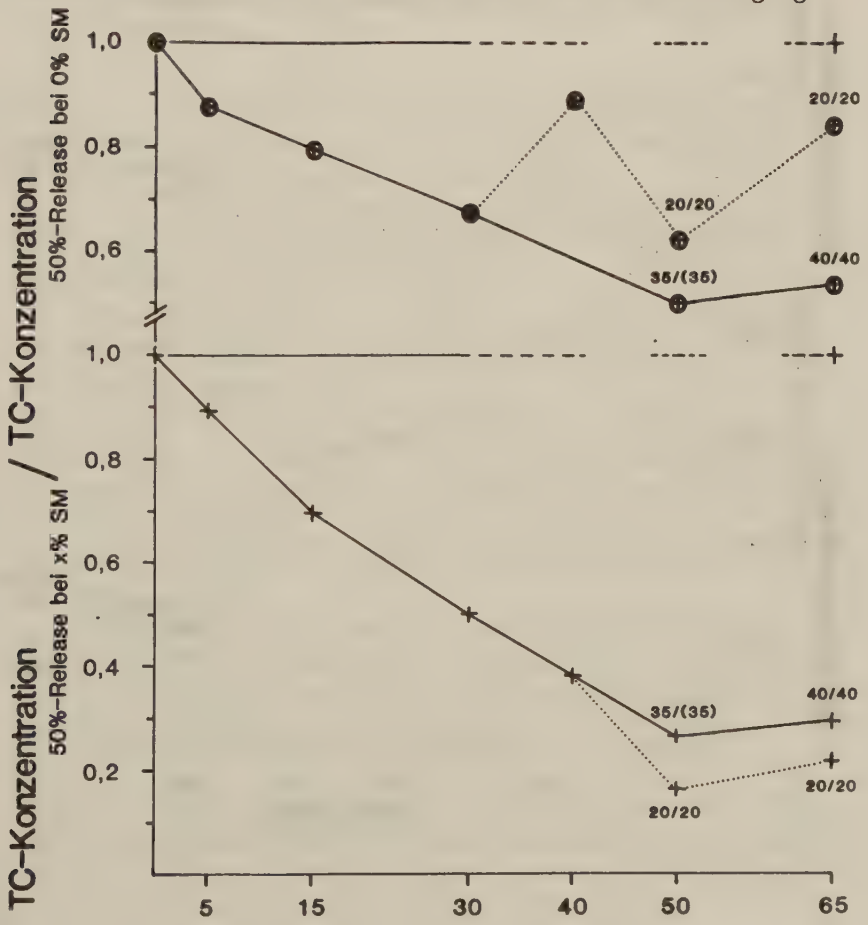
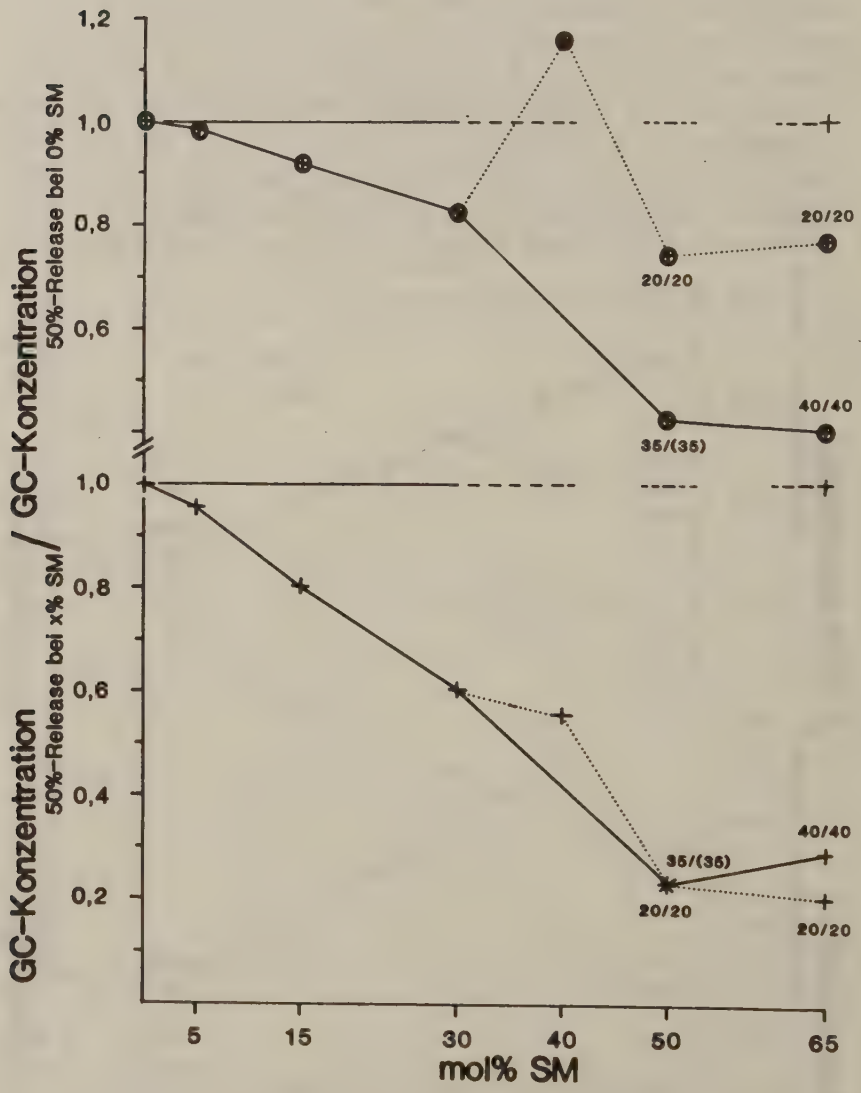


Abbildung 24: Relative Glykocholat-Resistenz von Liposomen mit verschiedenem SM-Gehalt im Vergleich zu reinen Lecithin-Liposomen. Vergleiche Abb. 22 und 23 .



3.2.3.1. Abhängigkeit der Gallensäure-Resistenz vom Sphingomyelin-Gehalt

Man kann also festhalten:

SM destabilisiert die Membran gegenüber dem Angriff von Gallensäuren.

a) Bis zu einem ESM-Gehalt von 30% ist dieser Zusammenhang fast linear.
b) Bei 20°C inkubierte 40ESM-Liposomen, auch die bei 40°C präpariert wurden, zeigen ein mit dem übrigen Kurvenverlauf diskrepantes Verhalten. Sie sind im wesentlichen stabiler als vermutet.
c) Zwischen 50 und 65% ESM-Gehalt neigt sich die Stabilitätskurve wieder nach oben.

zu a) - Mit steigendem ESM-Gehalt nimmt die Gallensäure-Resistenz der Liposomen fast linear ab; selbst ein sehr geringer ESM-Gehalt von nur 5% zeigt schon eine destabilisierende Wirkung.

- Auf reine Lecithin-Liposomen hat GC schon bei niedrigeren Konzentrationen als TC einen schädigenden Effekt, welches wiederum bei niedrigeren Konzentrationen als C wirkt.

Bei steigendem SM-Gehalt sinkt die Resistenz gegenüber TC stärker als die Resistenz gegenüber C, und diese nimmt wiederum deutlicher ab als die Resistenz gegenüber GC.

Dies hat zur Folge, daß bei 30% SM-Gehalt TC schon bei niedrigeren Konzentrationen die Liposomen schädigt als GC, was hier wiederum wirkungsvoller als C ist - das Verhältnis der Wirksamkeit von GC und TC hat sich umgekehrt.

TC hat also eine besonders schädigende Wirkung auf Membranen, die SM enthalten.

- Auffällig ist. daß beim Vergleich des Inulin-Releases mit dem Lecithin-Release nicht etwa die Kurven der relativen Destabilisierung in etwa parallel verlaufen, sondern die Kurven der absoluten Gallensäure-Konzentrationen.

zu b) - Bei 40°C präparierte 40ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C und damit innerhalb des Temperaturbereichs ihres Phasenübergangs inkubiert

wurden, zeigten ein von den erwarteten Werten abweichendes Verhalten (s. Tab. 13).

Tabelle 13 : Abweichen der tatsächlichen Gallensäureresistenz von bei 40°C präparierten 40ESM-Liposomen im Vergleich zu den nach dem gesamten Kurvenverlauf zu vermutenden Werten.

Gallensäure	Permeabilisierung	Solubilisierung
C	↓	–
TC	–	↑
GC	↑	↑↑

- Gegenüber GC und auch TC verhalten sich diese Liposomen stabiler als vermutet.
- Besonders bezüglich der Lecithin-Freisetzung zeigen sie sich stabiler als erwartet: Sie trat erst bei höheren TC-Konzentrationen als bei 5ESM und bei höheren GC-Konzentrationen als bei reinen Lecithin-Liposomen auf. Letzteres bedeutet nicht etwa eine nur unvermutet geringere destabilisierende Wirkung, sondern sogar einen stabilisierenden Effekt.

- Einige Inkubationsversuche bei 20 - 25°C mit bei 20 - 25°C präparierten 40ESM-Liposomen sind hier nicht in die Graphiken aufgenommen, weil diese Liposomenpräparationen starke Besonderheiten aufwiesen, weil eine dieser Präparationen nach einigen Tagen Aufbewahren bereits ohne Gallensäure-Zusatz einen maximalen Inulin-Release zeigte und weil die Inkubationsversuche stark variierende Werte ergaben. Sie seien hier nur grob beschrieben und sind mit gebührender Vorsicht zu bewerten:
- Diese Werte differierten deutlich von den Werten für 40ESM-Liposomen, die bei 40°C präpariert wurden. Außer beim Lecithin-Release durch TC erwiesen sich diese Liposomen als instabiler als die 30ESM-Liposomen, und außer beim Inulin-Release durch C erwiesen sie sich als instabiler als bei 40°C präparierte 40ESM-Liposomen.
- Die Werte für aufgewirbeltes Sediment und aufgewirbelte Gesamtsuspension entsprachen sich in etwa. Die Vesikel im Überstand erwiesen sich als stabiler.

zu c) - Da 50ESM- bzw. 65ESM-Liposomenmembranen bei 20 - 25°C am unteren Rand bzw. unterhalb ihres Phasenübergangs vorliegen, können, um Membranen mit wenigstens in etwa gleichem Phasenverhalten zu vergleichen, nur die Inkubationen bei 35 - 40°C bzw. 40 - 45°C denen der 0 - 30ESM-Liposomen gegenübergestellt werden. Da weiterhin reine Lecithin-Liposomen bei diesen Temperaturen andere Ausgangswerte als bei 20 - 25°C liefern, ist die einzige aussagekräftige Gegenüberstellung diejenige der temperaturabhängigen relativen Gallensäure-Resistenz (Quotient aus Gallensäure-Konzentration, die einen 50%igen Release von Inulin bzw. Lecithin aus Liposomen mit einem bestimmten SM-Gehalt bei einer bestimmten Temperatur oberhalb des Phasenübergangs bewirkt, und Gallensäure-Konzentration, die einen 50%igen Release von Inulin bzw. Lecithin aus reinen Lecithin-Liposomen bei der gleichen Temperatur bewirkt).

Dieser Vergleich ergibt, daß die Werte für bei 35 - 40°C inkubierte 50ESM-Liposomen in etwa im extrapolierten Kurvenverlauf (Der Kurvenverlauf von 0% bis 30% SM-Gehalt wurde weiter extrapoliert.) zu liegen kommen - sie zeigen also bei zunehmendem SM-Gehalt die zu erwartende zunehmende Destabilisierung. Bezüglich des Lecithin-Releases bei GC-Inkubation erweisen sie sich sogar als weit instabiler als der Extrapolation nach zu vermuten gewesen wäre.

Im Vergleich zu den 50ESM-Liposomen zeigt die temperaturabhängige relative Gallensäure-Resistenz bei 65ESM-Liposomen nur bezüglich des Inulin-Releases durch C eine weitere Abnahme, minimal auch bezüglich des Lecithin-Releases durch GC. In allen anderen Fällen aber erhöht sich die temperaturabhängige relative Gallensäure-Resistenz - wenn auch nur unbedeutend. (Nie aber ist die die Resistenz von 65ESM-Liposomen größer als die von 30ESM-Liposomen.) Dies bedeutet, daß eine Art Sättigungseffekt eingetreten ist: eine weitere Erhöhung des SM-Gehalts führt nicht mehr zu einer weiteren Membrandestabilisierung.

- Dieser Sättigungseffekt zeigt sich bei der C-Inkubation noch nicht so deutlich.

- Dieser Sättigungsdeffekt zeigt sich bezüglich des Lecithin-Releases in ungefähr gleichen Ausmaß wie bezüglich des Inulin-Releases.

3.2.3.2. Abhängigkeit der Gallensäure-Resistenz von der Inkubationstemperatur

Wärme stabilisiert die Membran gegenüber dem Angriff von Gallensäuren.

a) Reine Lecithin-Liposomen sind in Wärme stabiler - besonders gegenüber GC und hinsichtlich der Solubilisierung.
b) Auch 50- und 65ESM-Liposomen sind in Wärme stabiler gegenüber Gallensäuren - besonders hinsichtlich der Permeabilisierung.

zu a) - Reine Lecithin-Liposomen erweisen sich bei Inkubation im Temperaturbereich von 40 - 45°C als bedeutend stabiler als bei Inkubation im Temperaturbereich von 20 - 25°C, welcher hier natürlich auch oberhalb der Übergangstemperatur liegt (s. Tab. 14).

Tabelle 14: Stabilisierung von reinen Lecithin-Liposomen gegenüber dem Angriff von Gallensäuren durch Wärme. Quotient aus Gallensäurekonzentration, die eine 50%ige Permeabilisierung bzw. eine 50%ige Solubilisierung bei 40-45°C bewirkt, und Gallensäurekonzentration, die einen entsprechenden 50%-igen Release bei 20-25°C bewirkt.

Gallensäure	Permeabilisierung	Solubilisierung
C	0,9	1,1
TC	1,4	1,6
GC	1,7	2,3

- Diese Stabilitätserhöhung durch Wärme gilt nicht für die Inkubation mit Cholat. Am ausgeprägtesten zeigt sich dieser Unterschied bei GC-Inkubation: zum 50%igen Lecithin-Release ist bei 40 - 45°C eine über doppelt so hohe Gallensäure-Konzentration wie bei 20 - 25°C nötig.

- Der stabilisierende Effekt der Wärme ist bezüglich der Membranemulgierung deutlich stärker als bezüglich des Inulin-Releases. Bei der C-Inkubation bewirkt die Temperaturerhöhung bezüglich der Inulinfreisetzung sogar eine geringfügige Destabilisierung.

zu b) - Auch 50ESM- bzw. 65ESM-Liposomen sind bei 35 - 40°C bzw. 40 - 45°C stabiler (in absoluten Zahlen ausgedrückt allerdings nicht so deutlich stabiler als reine Lecithin-Liposomen) als im Temperaturbereich von 20 -25°C, in dem diese Membranen am unteren Rand bzw. unterhalb des Bereichs ihres Phasenübergangs vorliegen (s.Tab.15 und 16).

Tabelle 15 : Stabilisierung von 50ESM-Liposomen gegenüber dem Angriff von Gallensäuren durch Wärme. Quotient aus Gallensäurekonzentration, die eine 50%ige Permeabilisierung bzw. eine 50%ige Solubilisierung bei 35-40°C bewirkt, und Gallensäurekonzentration, die einen entsprechenden 50%igen Release bei 20-25°C bewirkt.

Gallensäure	Permeabilisierung	Solubilisierung
C	1,7	1,0
TC	2,1	1,2
GC	1,6	1,1

Tabelle 16 : Stabilisierung von 65ESM-Liposomen gegenüber dem Angriff von Gallensäuren durch Wärme. Quotient aus Gallensäurekonzentration, die eine 50%ige Permeabilisierung bzw. eine 50%ige Solubilisierung bei 40-45°C bewirkt, und Gallensäurekonzentration, die einen entsprechenden 50%igen Release bei 20-25°C bewirkt.

Gallensäure	Permeabilisierung	Solubilisierung
C	1,4	1,1
TC	1,9	1,0
GC	2,4	1,2

Zwischen dem verschiedenen Ausmaß der Temperaturerhöhung bei 50ESM- bzw. 65ESM-Liposomen und dem verschiedenen Phasenverhalten dieser Liposomen bei 20 - 25°C einerseits und der stabilisierenden Wirkung durch diese verschiedenen Temperaturerhöhungen andererseits läßt sich

hier kein Zusammenhang erkennen.

- Die membranstabilisierende Wirkung von Wärme auf 50ESM- bzw. 65ESM-Liposomen ist bei Inkubation mit TC bzw. bei Inkubation mit GC am deutlichsten.

- Die höheren Temperaturen bewirken, betrachtet man die absoluten Zahlen, eine in etwa gleich große Verschiebung des Inulin- bzw. des Lecithin-Releases. Berechnet man die relative Membran-Stabilisierung durch Wärme, erweisen sich beim Inulin-Release aufgrund der sehr niedrigen absoluten Werte bei 20 - 25°C-Inkubation diese geringen Differenzen als prozentual bedeutend; für den Lecithin-Release gilt dieser Effekt schon nicht mehr.

Bezüglich des Lecithin-Releases ist die schon geringe relative Gallensäure-Resistenz bei einem hohen SM-Gehalt (ausgedrückt als Quotient der Gallensäure-Konzentration, die einen 50%igen Release von Lecithin aus 50ESM- bzw. 65ESM-Liposomen bewirkt, und der Gallensäure-Konzentration, die einen 50%igen Release von Lecithin aus 0ESM-Liposomen bei gleicher Temperatur bewirkt) bei höheren Temperaturen noch kleiner als bei niedrigen Temperaturen. Oder anders gesagt: Bezüglich des Lecithin-Releases sind Liposomen mit hohem SM-Gehalt zwar stabiler, könnten aber noch stabiler sein, wenn der hohe SM- Gehalt bei hohen Temperaturen nicht einen stärker destabilisierenden Effekt als bei niedrigen Temperaturen hätte.

Bezüglich des Inulin-Releases verringert die Temperaturerhöhung die destabilisierende Wirkung des hohen SM-Gehalts - sie bewirkt hier also das genaue Gegenteil als beim Lecithin-Release.

4. Diskussion

4.1. Probleme bei der Liposomenpräparation

4.1.1. Probleme bei der Präparation unterhalb der Übergangstemperatur

Wurden Liposomen unterhalb oder im Bereich ihrer Übergangstemperatur präpariert, ergaben sich große Inhomogenitäten in Größe und Lamellenzahl. Bei 40% ESM-Gehalt zeigte sich nach der Präparation bei Zimmertemperatur eine Trübung - Hinweis auf das Vorliegen größerer Partikel. Das Material durchwanderte aber dennoch das Chromatographie-Gel mit einer Ausschlußgröße von ca. 100 nm. Die Elutionsdiagramme wiesen außerdem danach eine gewisse Anzahl wesentlich kleinerer Partikel nach. Nach der Behandlung durch Aufwirbeln verschwand die nur durch das Vorliegen größerer Partikel zu erklärende Trübung und es fand sich wieder die gewohnte Opaleszenz. Auch waren nach dieser Behandlung die kleinen Partikel nach Rechromatographieren nicht mehr nachzuweisen. Die jetzt gefundenen Vesikel hatten einen recht einheitlichen Durchmesser von durchschnittlich 170 - 180 nm. Es liegt also nahe zu vermuten, daß zunächst Aggregationn kleiner Vesikel vorlagen, die durch die mechanische Behandlung oder die Abtrennung von Restdetergens sich zu großen einheitlichen Vesikeln umwandelten.

4.1.2. Probleme bei der Präparation von Liposomen mit sehr hohem ESM-Gehalt

70% ESM enthaltende Präparationen ergaben selbst bei 53°C nur ein inhomogenes Gemisch aus uni- und hauptsächlich multilamellaren Liposomen verschiedenster Größe. Daß die Ausbeute an unilamellaren Vesikeln bei der Präparation von Liposomen mit sehr hohem SM-Gehalt stark zurückgeht wurde bereits beschrieben: Lentz et. al. (34) gewannen nur noch 10% des Lipids nach Beschallung großer multilamellarer Vesikel mit einem Palmitoyl-SM-Gehalt von 70 und 86% als kleine unilamellare Vesikel bei der Ultrazentrifugation - im Gegensatz zu einer Ausbeute von 50 - 70% bei einem niedrigeren SM-Gehalt in solchen Palmitoyl-SM - Dimyristoyl-PC - Gemischen. Diese Suspensionen wurden während der ganzen Behandlung im Temperaturbereich von 40 - 50°C gehalten.

- Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Studie von Yeagle et. al. (71), die für RHSM zwischen 28 und 37°C einen Umschlag eines ^{31}P-NMR-Signals von der lamellaren zur hexagonalen Struktur feststell-

ten; aber schon 20% Eidotter-Lecithin stabilisierten das SM gegen die wärmeinduzierte Destabilisierung der lamellaren Struktur. Eigene ^{31}P-NMR-Studien zeigten für 85ESM-Präparationen - allerdings wieder bei 25°C - eine lamellare Struktur.

- Noch komplexer stellt sich dieses Problem dar, berücksichtigt man Studien mit allerdings kleinen unilamellaren Di-Palmitoyl-PC - Liposomen, die eine Umwandlung dieser kleinen beschallten Liposomen in multilamellare Vesikel bei niedrigen Temperaturen und eine Aggregation kleiner Liposomen bei hohen Temperaturen nahelegt (61). Für Di-Myristoyl-PC schlossen Gershfeld et. al. (24) auf eine nur knapp oberhalb der Übergangstemperatur gelegene Temperatur, bei der unilamellare Vesikel sich zu großen multilamellaren Strukturen zusammenschließen. Auch bei unseren Präparationen scheinen Fusionen wahrscheinlich, da auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen Liposomen zu fusionieren im Begriff scheinen und auf einer Aufnahme der 70ESM-Präparation sich Einschlüsse finden, deren Aspekt dem von "lipidic particles" ähnelt, denen eine Bedeutung bei Membranfusionen zugeschrieben wird (65).
Da sich aber große unilamellare Liposomen mit verschiedenstem SM-Gehalt - liegen sie einmal als solche vor - im weiten Temperaturbereich von Herstellungstemperatur (20°C bzw. 40°C bzw. 53°C) bzw. hoher Inkubationstemperatur (35 - 40°C bzw. 40 - 45°C) bis zur Kühlraumtemperatur von + 4°C als stabil erweisen, dürfte letzterer Aspekt für einmal ausgebildete unilamellare Bilayers ohne starke Krümmung und damit Wandspannung nur von geringer Bedeutung sein. Angesichts der Existenz von "lipidic particles" ähnelnden Strukturen - diese finden sich nur in Systemen, in denen mindestens eines der Phospholipide zur Ausbildung von Hexagonal-II-Phasen neigt (65) - und des oben beschriebenen Phasenumschlags von SM in Wärme (34) dürften sich erneute ^{31}P-NMR-Studien bei 53°C als aufschlußreich erweisen.

4.2. Eigenschaften der Liposomen

ESM bildet - wie zu erwarten - mit seinen durchweg kurzen Seitenketten trotz seines hohen Sättigungsgrads bei 30% Membrananteil fluidere Membranen als RHSM oder SESM. SESM-Membranen sind bei gleicher durchschnittlicher Kettenlänge aufgrund des höheren Sättigungsgrads etwas visköser als RHSM-Membranen.
Für ein und dieselben Mischungspartner ergibt sich nach der Theorie

von Fromherz et. al. (23), daß die diskoiden gemischten Micellen durch die Randspannung des Cholats sich bei der Liposomenbildung umso schlechter krümmen lassen, d.h. unso größere Liposomen bilden, je rigider diese Membranstücke sind. Der größere Durchmesser von SM-haltigen gegenüber reinen Eidotter-Lecithin-Liposomen bei Präparation bei Zimmertemperatur kann durch die höhere Rigidität bei Annäherung an die Übergangstemperatur erklärt werden. Die Theorie von Fromherz et. al. wird ebenfalls dadurch unterstützt, daß bei höheren Temperaturen präparierte Liposomen geringere Durchmesser haben.

RHSM- und SESM-Liposomen-Membranen sind zwar rigider als die mit einem gleichen Gehalt (30%) an ESM hergestellten Liposomen-Membranen; ihre Größe liegt aber dennoch unter der von 30ESM-Liposomen. Dies könnte auf eine deutlich unterschiedliche Interaktion von ESM einerseits und RHSM und SESM andererseits mit Gallensäuren zurückzuführen sein. Durch den bewirkten reduzierten Lipid-Molekül-Abstand dürften wohl lange Seitenketten und auch ein geringer Sättigungsgrad (SESM bildet bei gleicher Kettenlänge wie RHSM aber höherem Sättigungsgrad als RHSM bei gleichem Gehalt kleinere Liposomen.) die Bindung von Gallenäuren an SM-haltige Bilayer-Oberflächen erschweren. Dichter gepackte Kohlenwasserstoffketten führen außerdem zu erhöhter Hydrophobizität in der inne- ren Bilayer-Schicht. Beide Effekte zusammen führen in diskoiden gemischten Micellen wahrscheinlich zu einer stärkeren Bindung des Cholats an die Kanten der Eidotter-Lecithin - RHSM bzw. SESM - Aggregate, verglichen mit Eidotter-Lecithin - ESM - Aggregaten. Diese erhöhte Kantenspannung führt wiederum (nach Fromherz et. al.) trotz rigiderer Membran bei langen Seitenketten zu höheren Membrankurvaturen bei der Vesikelentstehung, d.h. kleineren Liposomen.

Die geringere Bindung von Gallensäuren an RHSM- bzw. SESM-Membranen im Vergleich zu ESM-Membranen spiegelt sich auch in der höheren Gallensäure-Resistenz von RHSM- bzw. SESM-Liposomen wider. Die abnehmende Resistenz von Eidotter-Lecithin-Membranen gegenüber C, GC und TC bei zunehmendem SM-Gehalt könnte ebenso mit einer andersartigen Gallensäure-Bindung an die Membranoberfläche erklärt werden: Der geringe Molekülabstand in SM-Membranen läßt vermuten, daß Cholat sich nur schlecht als Monomer auf die Membran, dagegen leichter als Dimer in den Bilayer einlagert - letzteres hätte eine stärkere Störung der lamellaren Struktur zur Folge. Genaueres darüber kann aber erst nach

entsprechenden Bindungsstudien ausgesagt werden. Auch der Einfluß der veränderten Wasserstoff-Brücken-Bindungsfähigkeit und Änderungen der Membranoberflächenhydratation müssen untersucht werden.

4.3. Sphingomyelin und Gallensäure-Resistenz

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, daß SM die Lecithin-Membran gegenüber Gallensäuren sensibler macht, und daß diese Destabilisierung der durchweg im flüssig-kristallinen Zustand vorliegenden Membranen gegenüber einem Gallensäure-Angriff sich zunächst fast linear mit steigendem SM-Gehalt erhöht. Erst bei 50 - 65% ESM-Gehalt scheint eine Art Sättigungseffekt eingetreten zu sein - eine weitere Zunahme der Empfindlichkeit gegenüber Gallensäuren ist nicht mehr festzustellen; die relativ geringen Einschlüsse von Lecithin haben dann nur noch einen geringen Einfluß auf die Membran-Eigenschaften.

Wie ließen sich nun die Widersprüche zwischen den Ergebnissen von Colemann et. al. (4 , 13 , 16), die für Erythrozyten-Membranen eine deutliche Korrelation zwischen SM-Gehalt und Gallensäure-Resistenz sahen, und der hier gefundenen geringen Resistenz SM-haltiger Membranen auflösen?

Vielfach belegt ist eine positive Korrelation zwischen dem SM-Anteil und dem Cholesterol-Anteil an den Gesamtlipiden von Membranen (18) - dies insbesondere für die verschiedenen Membranen des Hepatozyten der Ratte (44). Für Erythrozyten-Membranen läßt sich eine solche Korrelation zwar nicht nachweisen; der Cholesterol-Gehalt ist dort aber durchgehend außerordentlich hoch: um ein Drittel der Gesamtlipide (42).

Auch eine besondere Affinität von Cholesterol zu SM aufgrund noch ungeklärter Interaktionen wurde wiederholt diskutiert:

- Wie bei Lecithinen, so wird auch die Fluidität von SM-Bilayers bei Zumischung von Cholesterol oberhalb der Übergangstemperatur erniedrigt, unterhalb der Übergangstemperatur erhöht (2).
- Ebenfalls wie zusammen mit Lecithinen erniedrigt Cholesterol mit Sphingomyelinen die calorimetrisch bestimmten Enthalpien des Phasenübergangs; oberhalb eines Cholesterol-Gehalts von 25 - 40% zeigen Gemenge mit Sphingomyelinen keinen Phasenübergang mehr (9 , 18 , 20 , 43).
- In lateral separierten Systemen von Sphingomyelinen zusammen mit

Lecithinen zeigt sich dieser Effekt bei steigendem Cholesterol-Gehalt zuerst beim Phasenübergang des SM, sei es nun das Phospholipid mit der höheren oder niedrigeren Übergangstemperatur; das Cholesterol muß sich also in den SM-Domänen anreichern (18). Liegen keine Domänen-Bildungen vor, ist dieses Phänomen auch nicht zu beobachten (9).

- Tirri et. al. (62) und Demel et. al. (18) vermuten diese Interaktionen von Cholesterol mit SM-Bilayers in Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen der ß-Hydroxy-Gruppe des Cholesterols mit dem Hydratations-Wasser des Bilayer.

- Interessant ist auch, daß Cullis und Hope (17) nachwiesen, daß Cholesterol-Phosphatidyläthanolamin-Gemische in Anwesenheit von SM eine geringere Neigung zur Ausbildung nicht-lamellarer Strukturen haben als in Anwesenheit von Lecithinen.

Liposomen, die aus Lecithin und Cholesterol hergestellt wurden, zeigen im Vergleich zu reinen Lecithin-Liposomen eine deutlich gesteigerte Resistenz gegenüber Detergentien - sowohl Gallensäuren (52), als auch Triton-X-100 (29), wie auch Lysolecithin (28). Die Ursache dafür könnte in einem geringeren Bindungskoeffizienten von Gallensäuren an die mit strukturell ähnlichen Fremdmolekülen bereits gesättigten Membranen zu sehen sein. Eine ähnliche die Gallensäure-Resistenz erhöhende Wirkung von Beimengungen von Cholesterol zu SM-Membranen könnte also vermutet werden. Daß diese Stabilitätserhöhung extrem stärker als die bei Lecithin-Cholesterol-Gemischen sein könnte, ließe sich aufgrund der besonderen oben beschriebenen Interaktionen von SM und Cholesterol annehmen. Daß dies in so extremen Maß der Fall ist. daß SM-Cholesterol-Membranen gegenüber dem Angriff durch das allerdings nicht-ionische Detergens Triton-X-100 sich nicht etwa nur der Stabilität von aus Lecitin-Cholesterol-Gemischen hergestellten Membranen annähern, sondern sogar deutlich stabiler sind als diese, belegt schon eine Studie von Kinsky et. al. (31). Eine solche extreme Stabilitätszunahme von SM-Membranen in Anwesenheit von Cholesterol ist auch gegenüber dem Angriff von Gallenäuren anzunehmen. Eine eingehende experimentelle Studie darüber könnte auch über die diskutierten Interaktionen zwischen SM und Cholesterol weiteren Aufschluß geben.

4.4. Membranordnung und Gallensäure-Resistenz

50- und 65ESM-Liposomen-Membranen liegen bei Zimmertemperatur unterhalb der Übergangstemperatur vor. Werden deren Werte für Permeabilisierung und Solubilisierung zu den bei gleicher Temperatur für reine Lecithin-Liposomen gewonnenen Werte in Relation gesetzt und mit den entsprechenden Quotienten bei einer Inkubationstemperatur von 40 - 45°C verglichen, so fällt auf, daß die ESM-Membranen im Gel-Zustand bezüglich der Permeabilisierung eine relative Gallensäure-Resistenz zeigen, die der im flüssig-kristallinen Zustand entspricht. Bezüglich der Solubilisierung sind diese Membranen mit einem relativ hohen SM-Gehalt im Gel-Zustand etwas stabiler als im flüssig-kristallinn Zustand. (Dabei ist aber zu beachten, daß höhere Inkubationstemperaturen nicht nur auf Ordnungszustand und allgemein die Gallensäure-Resistenz (s. 4.5.) Einfluß nehmen, sondern auch auf eine Vielzahl anderer Faktoren, die die Bewertung erschweren.)

Einen höchst interessanten Sonderfall stellen die Inkubationsversuche von 40ESM-Liposomen dar, die im Temperaturbereich ihres Phasenübergangs Gallensäuren ausgesetzt wurden. Besonders die Resistenz gegenüber der Solublilisierung ist hier im Bereich des Phasenübergangs - bei gleicher Temperatur - größer als die von an sich stabileren Liposomen mit weniger ESM-Gehalt. (Die bei Zimmertemperatur hergestellten 40ESM-Präparationen, d.h. Aggregate oder multilamellare Vesikel, geben - wie zu erwarten - erst bei hohen Gallensäure-Konzentrationen Inulin frei. Die Membranen selber sind aber leichter zu emulgieren.) Da im Bereich des Phasenübergangs Phasenseparationen vorliegen, kann vermutet werden, daß diese Phasenseparationen, d.h. das gleichzeitige Vorliegen von Membrananteilen im Gel- und flüssig-kristallinen Zustand, offensichtlich die Emulgierung dieser Bilayers durch Gallensäuren erschweren.

Auch bei diesen Inkubationen innerhalb des Phasenübergangs wie in Wärme (s. 4.5.) erweisen sich die Konjugate des Cholats, TC und GC, als milder als das Cholat selbst.

4.5. Temperaturabhängigkeit der Gallensäure-Resistenz

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß Wärme die Membran gegenüber einem Gallensäure-Angriff stabilisiert.

- Über das unterschiedliche Emulsionsverhalten von Membranbausteinen

im allgemeinen und Phospholipiden im speziellen bei verschiedenen Temperaturen liegt zwar wenig Literatur vor; sie läßt aber eher eine verstärkte Wirkung von Detergentien bei höheren Temperaturen vermuten: Im tertiären System Waser-Cholesterol-NaCholat führt eine Temperaturerhöhung zu einer - wenn auch geringen - Vergrößerung des Bereichs in dem Cholesterol in emulgierter Form vorliegt (8); für Lecithin sind uns entsprechende Untersuchungen nicht bekannt. Vyvoda et. al. (67) inkubierten Rattenleber-Plasmamembran-Präparate bei 0 bzw. 37°C mit verschiedenen Gallensäuren, wobei die Inkubation bei 37°C zu einer größeren Freisetzung von Membranbestandteilen führte. Auch die Kritische Mizellare Konzentration (CMC) scheint sich bei einer Temperaturerhöhung von 20 auf 40°C etwas zu erhöhen (57), d.h. die Konzentration gelöster und damit direkt in die Membran einbaubarer Gallensäure-Monomere erhöht sich. Jedoch ist dieser Temperatureffekt auf die CMC oberhalb der Kritischen Mizellaren Temperatur (CMT) nur gering. Da C, TC und GC eine CMT unterhalb der Zimmertemperatur besitzen, scheint dieser Effekt deshalb nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.

- Eine geringere Membranresistenz bei höheren Temperaturen zeigte sich auch bei Triton-X-100 - Inkubation von verschiedenen Lecithin-Liposomen (29); eine kurze Nach-Inkubation nach einem Temperaturabfall von Zimmertemperatur auf 1°C führte allerdings zu einer beträchtlichen zusätzlichen Freisetzung von in die Liposomen eingeschlossener Glukose. Ein Temperaturabfall führt auch bei Lysolecithin-Inkubation von Lecithin-Liposomen zu einer starken Permeabilisierung für eingeschlossene Glukose (28). Lysolecithin schädigt menschliche Erythrozyten bei 0°C bei um ein Vielfaches geringeren Konzentrationen als bei 37°C (68). Hier Parallelen zu den in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnissen ziehen zu wollen führt aber weit ins Reich der Spekulation.

Könnten die vorliegenden Ergebnisse also auf ein Artefakt bei Verwendung der auf Zimmertemperatur geeichten Methode zurückzuführen sein?

Zwei Punkte fallen bei der Bewertung der Ergebnisse für Inkubationen bei hohen Temperaturen ins Auge:

- Für die Versuche bei 40 - 45°C ergaben sich die größten Divergenzen zwischen den verschiedenen Einzelbestimmungen; allerdings waren nur bei GC-Inkubationen von OESM-Liposomen und bei der TC-Inkubation von

65ESM-Liposomen extreme Divergenzen festzustellen. Die Ergebnisse der bei 35 - 40°C durchgeführten Versuche zeigten nur eine geringe Streuung.

- Allein bei Versuchen mit Inkubationstemperaturen von 35 - 40°C und 40 - 45°C zeigt sich in reinem Puffer bzw. bei extrem niedrigen Gallensäure-Konzentrationen eine relativ hohe ^{3}H- und in gleichen Maß ^{14}C-Aktivität; dieser Anfangsgipfel fällt schon bei Anstieg der Gallensäure-Konzentration auf relativ niedrige Werte schnell auf die Nullinie ab. Die Kurven zeigen dann den üblichen Verlauf.

Zunächst ist darauf hinzuweisen, daß das Schicksal der Liposomen vor ihrer Temperierung nicht genau festgelegt und definiert war, sodaß sich hiermit teilweise die Divergenzen der verschiedenen Einzelergebnisse erklären ließen.

Der Anfangsgipfel erklärt sich damit, daß hier die thermische Bewegung der Sedimentation der Liposomen stärker entgegenwirkt und erst durch die Einlagerung von Gallensäuren der zum Pelletieren nötige Sedimentationskoeffizient erreicht wird (53).

Auf der anderen Seite erreichen auch bei hohen Inkubations-Temperaturen die Release-Kurven im üblichen Rahmen der Abweichungen die 100%-Marke, sodaß nicht davon ausgegangen werden kann, daß gemischte Micellen durch eine starke Gallensäure-Einlagerung absedimentieren würden und somit der Erfassung im Überstand entgehen würden. Auch dürfte sich in diesem Fall die Inulin-Freisetzung nicht verschieben.

Eine weitere Möglichkeit der methodisch bedingten, scheinbaren Stabilitätserhöhung wäre evt. darin zu sehen, daß fluidere Membranen der mechanischen Beanspruchung bei der Sedimentierung nicht in dem Maße ausgesetzt wären wie viskösere bei niedrigeren Temperaturen. Eine so verursachte mechanische Beanspruchung führt aber - bei Zimmertemperatur - nach Schubert (53) nur zu einer Beschleunigung der Permeabilisierung und nicht der Solubilisierung.

Ein methodisches Artefakt scheint also der beobachteten Stabilitätserhöhung durch Wärme nicht zugrunde zu liegen. Dennoch wäre eine genauere Studie der im Überstand und Sediment vorliegenden Partikel und ihres Sedimentationsverhaltens eine sicherlich wünschenswerte Unterstützung dieser Überlegungen.

Auch für die Stabilitätserhöhung durch Wärme scheint naheliegend, eine Erklärung in einer Erniedrigung des Bindungskoeffizienten von Gallen-

säuren an die Liposomenmembranen - bei etwas besserer Löslichkeit im Puffer und deutlich größerer thermischer Bewegung der Phospholipid-Moleküle im Bilayer - zu suchen. Auch könnte spekuliert werden, daß die Gallensäure-Moleküle in der Membran eine größere laterale Beweglichkeit aufweisen und so ihnen die Aneinanderlagerung zu Abtrennung größerer discoider gemischter Micellen erschwert wird. Daß Wärme auf verschiedenen Ebenen die Interaktion von Gallensäuren mit Bilayern beeinflußt, läßt schon die Tatsache vermuten, daß bei reinen Lecithin-Liposomen vornehmlich die Solubilisierung und bei Liposomen mit relativ hohem SM-Anteil vornehmlich die Permeabilisierung erst bei deutlich höheren Gallensäure-Konzentrationen auftritt, wenn diese bei höheren Temperaturen inkubiert werden.

Schließlich ist noch darauf hinzuweisen, daß bei Wärme die Membranen gegenüber Cholat, welches ja physiologischerweise unkonjugiert in nur kleinen Mengen vorliegt, etwas stabiler sind als gegenüber den Tauro- und Glyko-Konjugaten des Cholats, die bei Zimmertemperatur Lecithin-Membranen noch stärker schädigen als Cholat. Ähnliches ergibt sich schon aus der Literatur: gegenüber Liposomen-Membranen verschiedenster Zusammensetzung erweist sich Cholat bei Zimmertemperatur durchgehend als milder als seine Konjugate (52 , 53); bei 37°C aber ist Cholat gegenüber "unsealed ghosts" von menschlichen Erythrozyten (14) wie gegenüber Präparationen von Ratten-Plasmamembran (67) aggressiver als seine Konjugate. Die Konjugation des Cholats könnte also unter anderem als Schutzmechanismus vor Membranschädigung bei Körpertemperatur zu verstehen sein.

5. Zusammenfassung

Bisherige Versuche mit Säugetier-Erythrozyten stellten eine positive Korrelation zwischen Sphingomyelin (SM) -Gehalt und Gallensäure-Resistenz dieser Membranen fest. Diese Zusammenhänge sollen anhand von großen unilamellaren Liposomen, die als Modell-Membranen allein aus zwei Komponenten (Eidotter-Lecithin und drei verschiedenen SM-Präparaten) mit annähernder Gleichverteilung in den beiden Monolayern hergestellt wurden, nachgeprüft werden. Bei der Präparation dieser Liposomen ergeben sich aufgrund der physikochemischen Besonderheiten des SM zwei Auffälligkeiten: Oberhalb eines Eidotter-SM-Gehalts von 30% ist bei diesen Phospholipid-Gemischen bei Zimmertemperatur der Phasenübergang noch nicht vollzogen und in diesem Temperaturbereich hergestellte Präparationen zeigen große Inhomogenitäten; oberhalb der Übergangstemperatur präparierte Liposomen sind wieder homogen und halten auch tieferen Temperaturen unbeschadet stand. Ab einem Eidotter-SM-Gehalt von 70% ergeben sich selbst bei Präparationen oberhalb der Übergangstemperatur hauptsächlich multilamellare Vesikel - unilamellare Bilayers erweisen sich hier als instabile Struktur.

Bei den Inkubationen mit den Gallensäuren Cholat, Taurocholat und Glykocholat stellt sich SM in krassem Gegensatz zu bisherigen Ergebnissen als ein die Resistenz der Membranen erniedrigender Faktor heraus: Je mehr SM die Membranen enthalten, bei umso niedrigeren Gallensäure-Konzentrationen werden sie für eingeschlossenes Inulin permeabilisiert bzw. emulgiert; erst um 50 - 65% Eidotter-SM-Gehalt tritt eine Art Sättigungseffekt ein und die Stabilität nimmt nicht weiter ab. Diese Ergebnisse werden im Lichte der besonderen Affinität von Cholesterol zu SM diskutiert.

Werden die Ergebnisse zu denen von reinen Lecithin-Liposomen-Membranen, die selbst bei Zimmertemperatur weit oberhalb ihrer Übergangstemperatur vorliegen, in Relation gesetzt, so fällt auf, daß die Membranen mit einem höheren SM-Gehalt hinsichtlich der Solubilisierung im Gelzustand stabiler sind als im flüssig-kristallinen Zustand; noch stabiler hinsichtlich der Solubilisierung sind sie im Bereich ihres Phasenübergangs.

Dessenungeachtet erweisen sich in absoluten Zahlen ausgedrückt alle Membranen bei oberhalb der Zimmertemperatur durchgeführten Inkubationen als stabiler. Deutlich höhere Gallensäure-Konzentrationen sind dann v.a. nötig, um reine Lecithin-Membranen zu permeabilisieren und um Membranen mit einem höheren SM-Gehalt zu solubilisieren.

6. Bildanhang

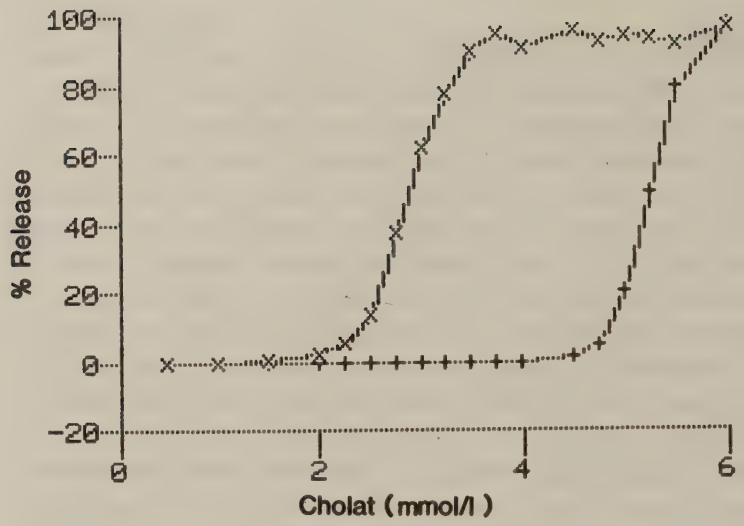


Abbildung 25: Permeabilisierung (linke Kurve) und Solubilisierung (rechte Kurve) von OESM-Liposomen, d.h. reinen Eidotter-Lecithin-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit C inkubiert wurden.

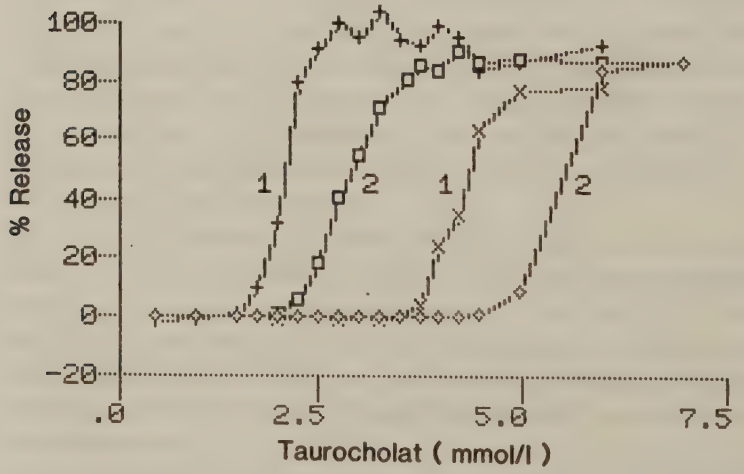


Abbildung 26: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von OESM-Liposomen, d.h. reinen Eidotter-Lecithin-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit TC inkubiert wurden.

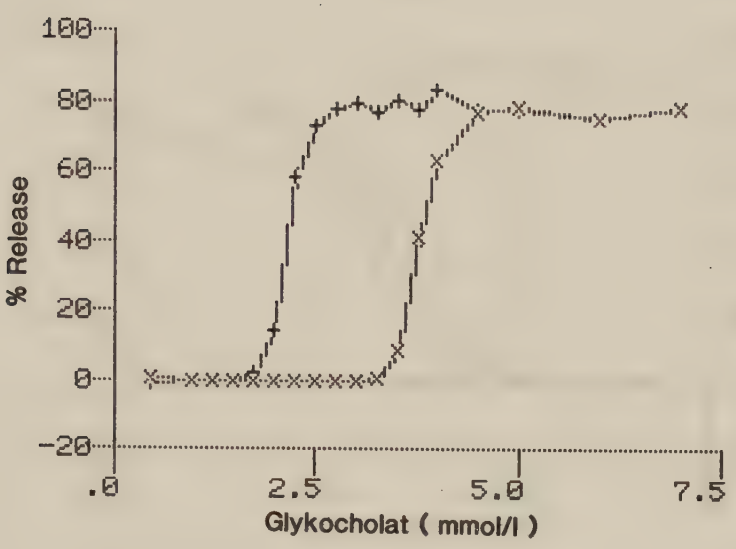


Abbildung 27 : Permeabilisierung (linke Kurve) und Solubilisierung (rechte Kurve) von OESM-Liposomen, d.h. reinen Eidotter-Lecithin-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit GC inkubiert wurden.

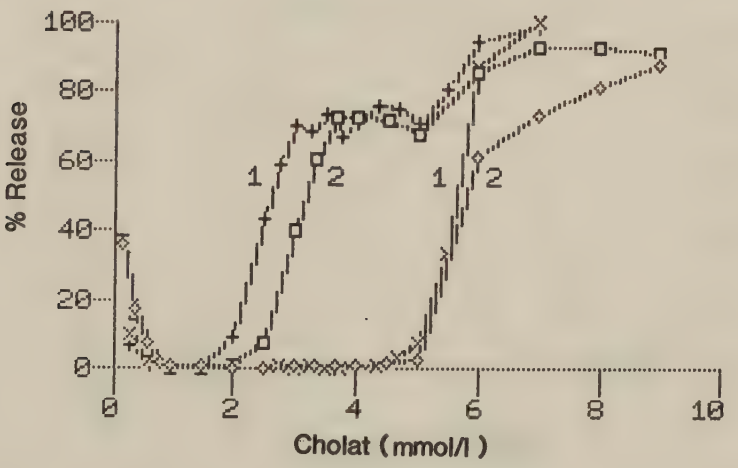


Abbildung 28 : Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von OESM-Liposomen, d.h. reinen Eidotter-Lecithin-Liposomen, die bei 40 - 45°C mit C inkubiert wurden.

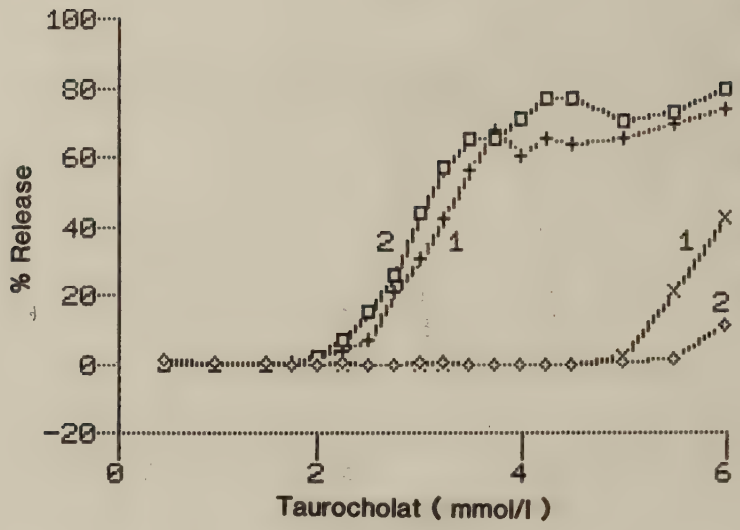


Abbildung 29: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von OESM-Liposomen, d.h. reinen Eidotter-Lecithin-Liposomen, die bei 40 - 45°C mit TC inkubiert wurden.

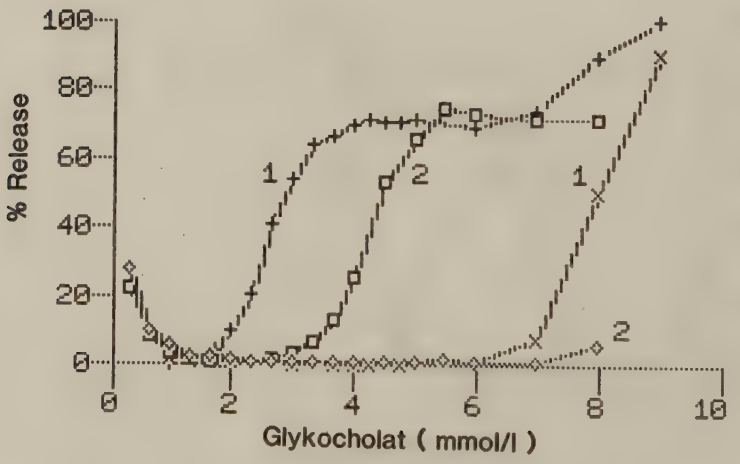


Abbildung 30: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von OESM-Liposomen, d.h. reinen Eidotter-Lecithin-Liposomen, die bei 40 - 45°C mit GC inkubiert wurden.

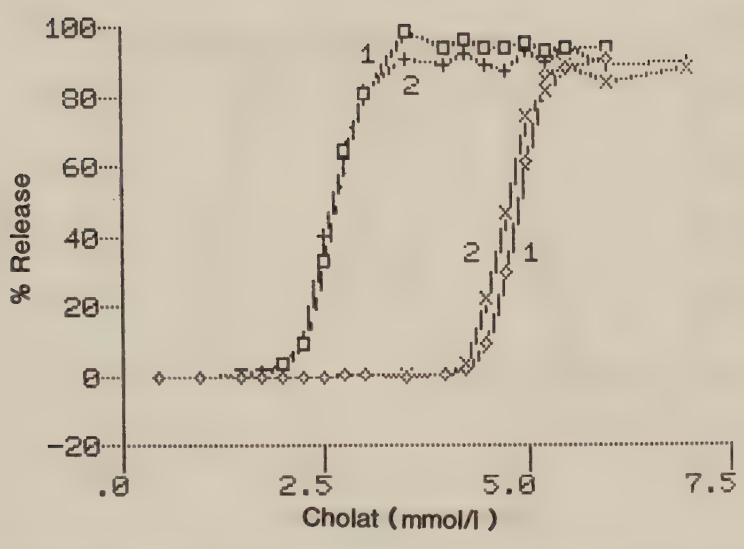


Abbildung 31: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 5ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit C inkubiert wurden.

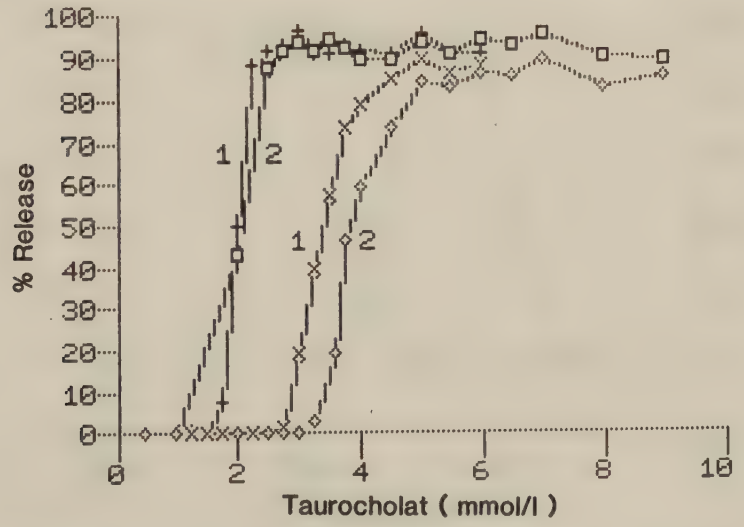


Abbildung 32 : Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 5ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit TC inkubiert wurden.

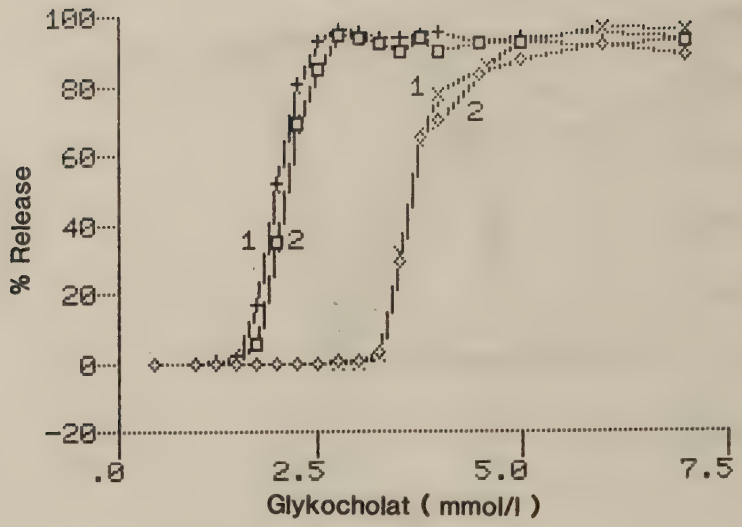


Abbildung 33: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 5ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit GC inkubiert wurden.

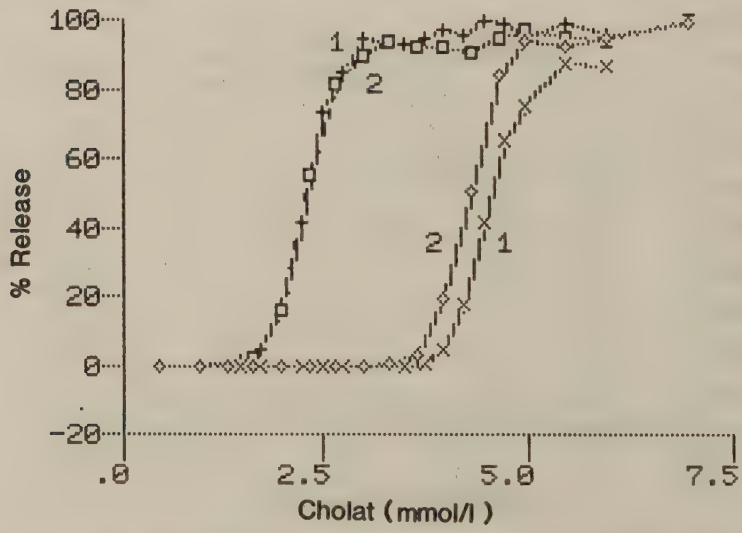


Abbildung 34: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 15ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit C inkubiert wurden.

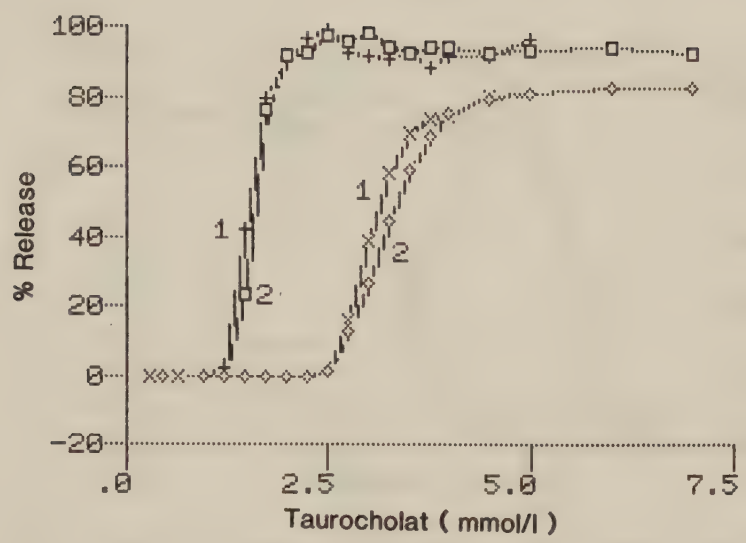


Abbildung 35: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 15ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit TC inkubiert wurden.

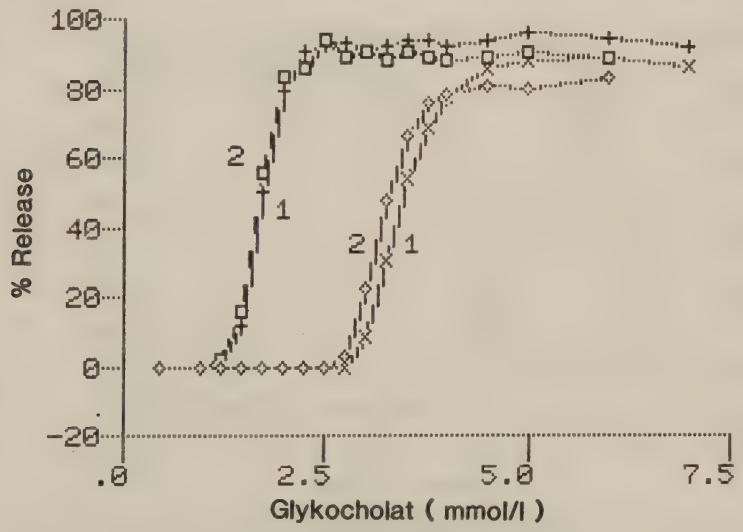


Abbildung 36: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 15ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit GC inkubiert wurden.

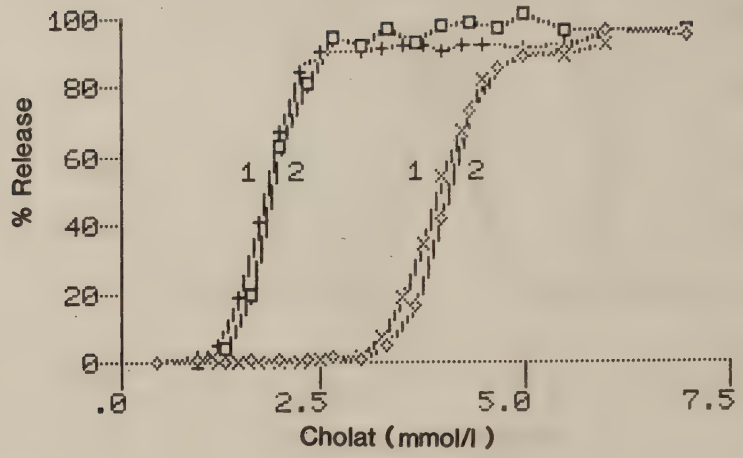


Abbildung 37: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 30ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit C inkubiert wurden.

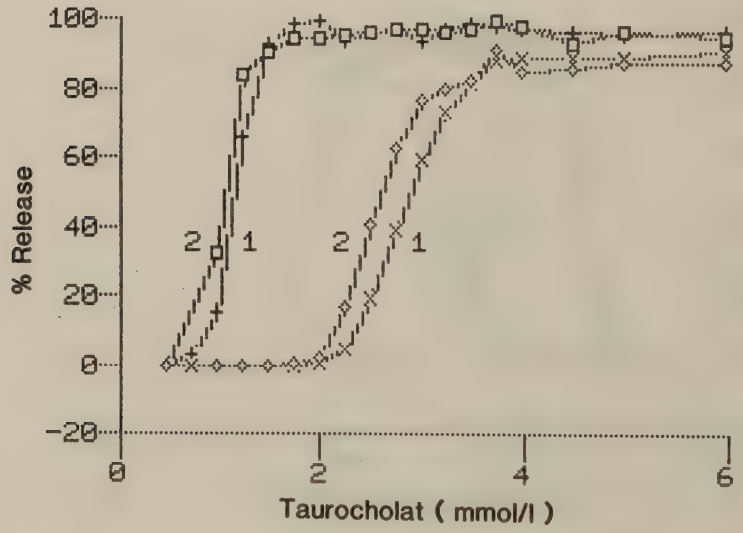


Abbildung 38: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 30ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit TC inkubiert wurden.

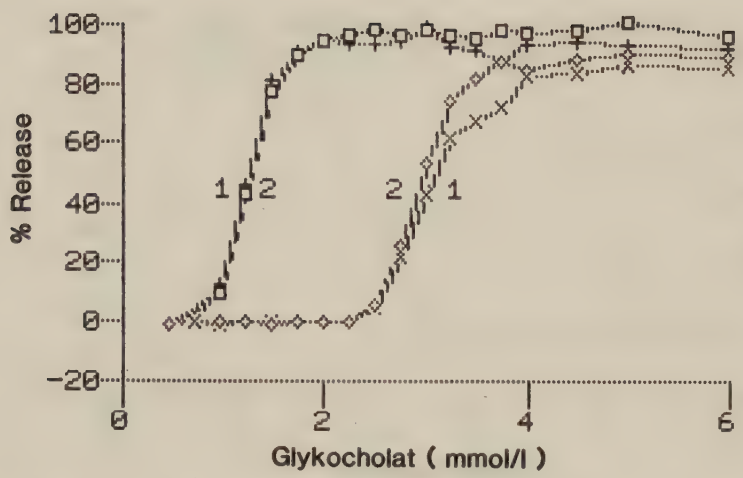


Abbildung 39: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 30ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit GC inkubiert wurden.

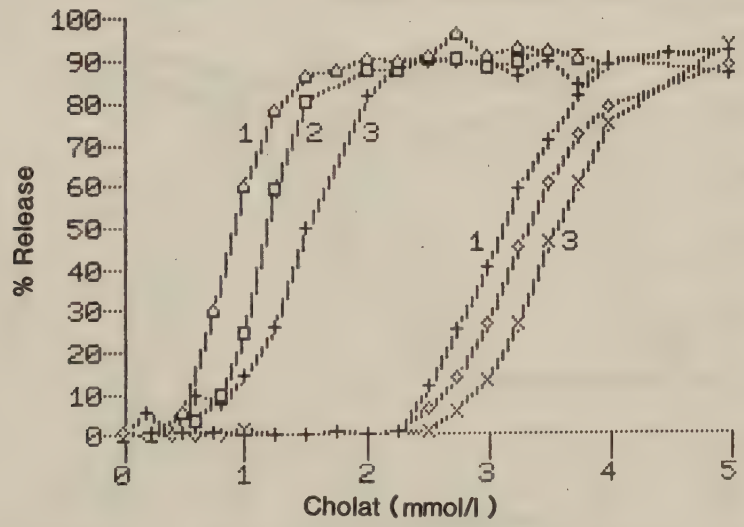


Abbildung 40: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von Liposomen aus aufgewirbelter Gesamtsuspension (1) bzw. Überstand (2,3) von bei Zimmertemperatur hergestellten 40ESM-Präparationen, die bei 20 - 25°C mit C inkubiert wurden.

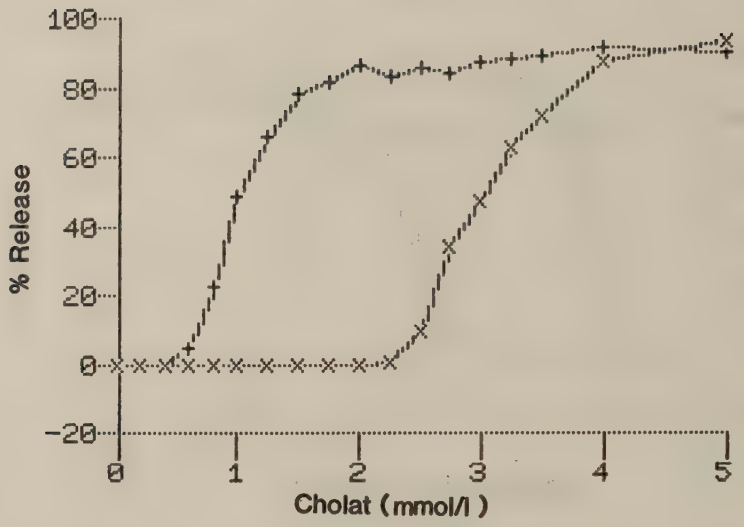


Abbildung 41: Permeabilisierung (linke Kurve) und Solubilisierung (rechte Kurve) von Liposomen aus dem Sediment einer bei Zimmertemperatur hergestellten 40ESM-Präparation, die bei 20 - 25°C mit C inkubiert wurden.

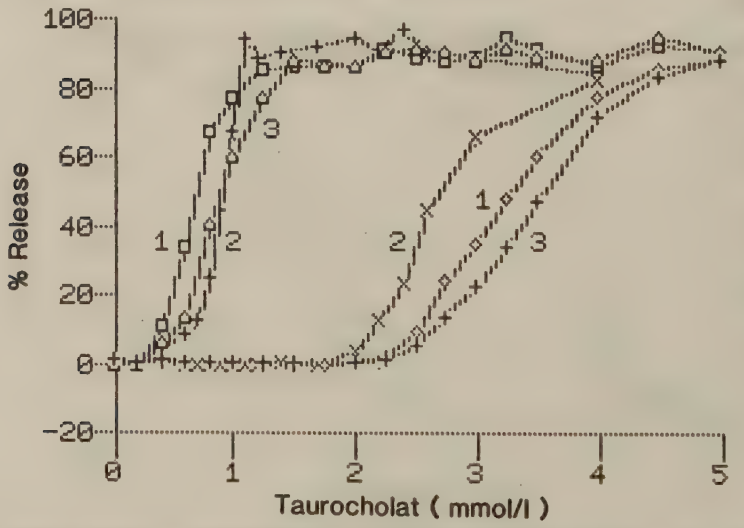


Abbildung 42: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von Liposomen aus aufgewirbelter Gesamtsuspension (1) bzw. Überstand (2,3) von bei Zimmertemperatur hergestellten 40ESM-Präparationen, die bei 20 - 25°C mit TC inkubiert wurden.

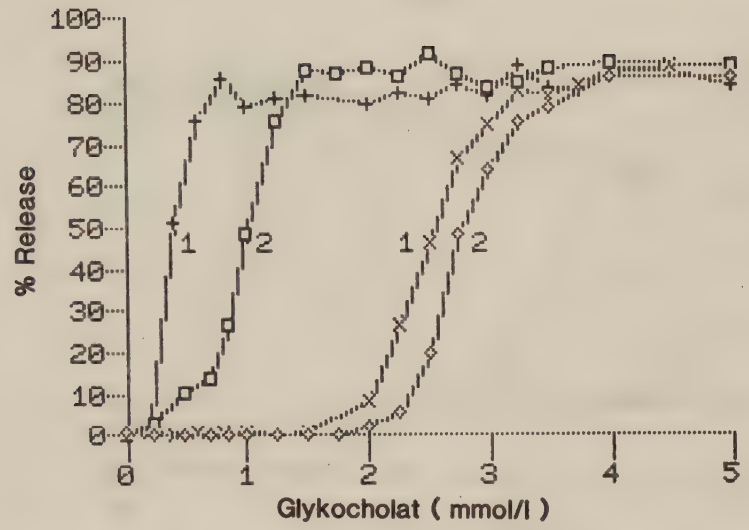


Abbildung 43: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von Liposomen aus aufgewirbelter Gesamtsuspension (1) bzw. Überstand (2) von bei Zimmertemperatur hergestellten 40ESM-Präparationen, die bei 20 - 25°C mit GC inkubiert wurden.

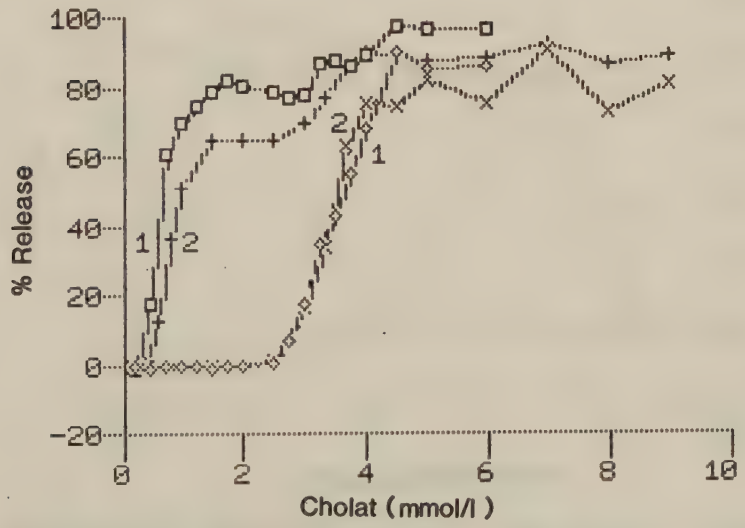


Abbildung 44: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von bei 40°C hergestellten 40ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit C inkubiert wurden.

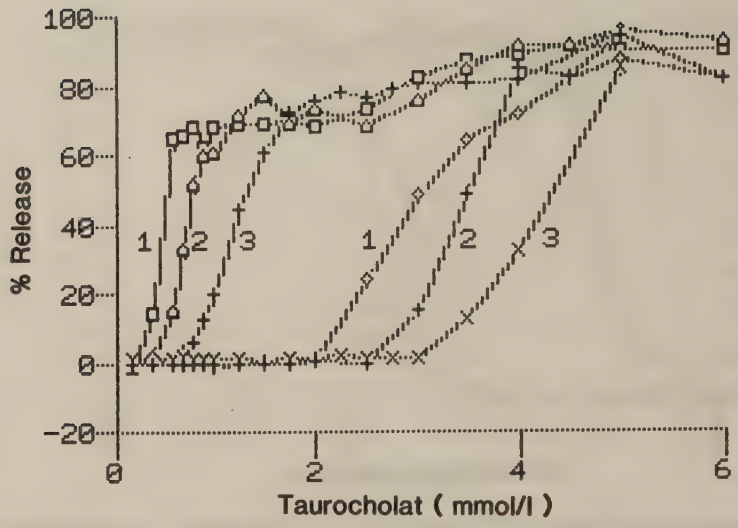


Abbildung 45: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von bei 40°C hergestellten 40ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit TC inkubiert wurden.

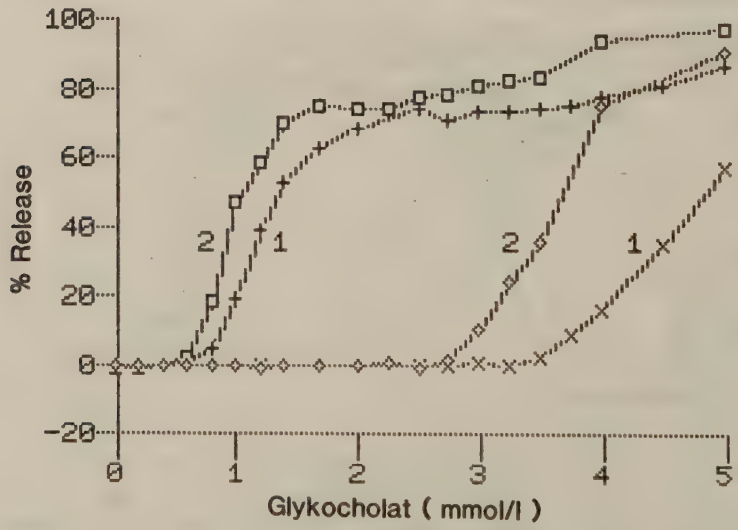


Abbildung 46: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von bei 40°C hergestellten 40ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit GC inkubiert wurden.

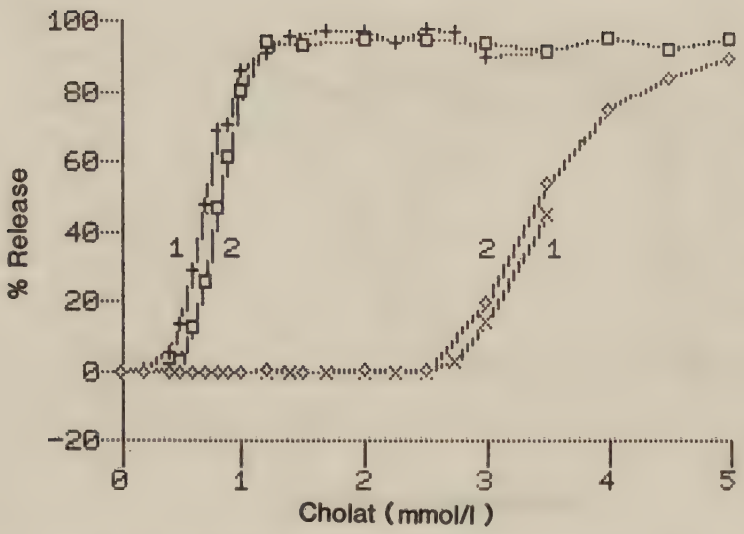


Abbildung 47: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurver) von 50ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit C inkubiert wurden.

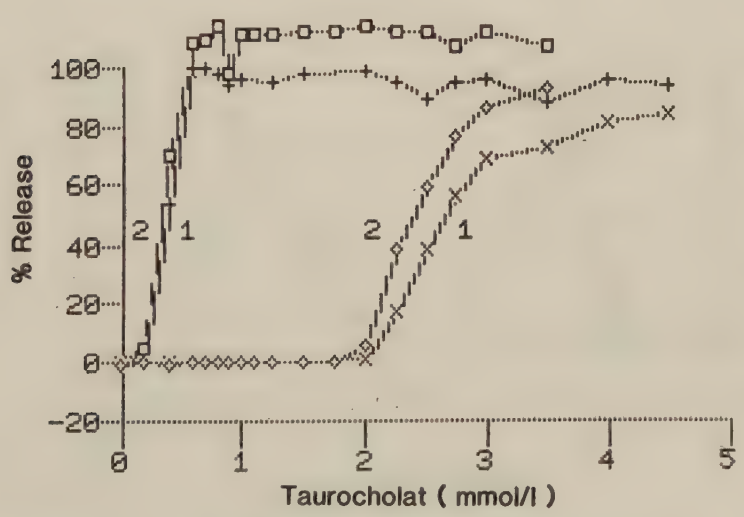


Abbildung 48: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 50ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit TC inkubiert wurden.

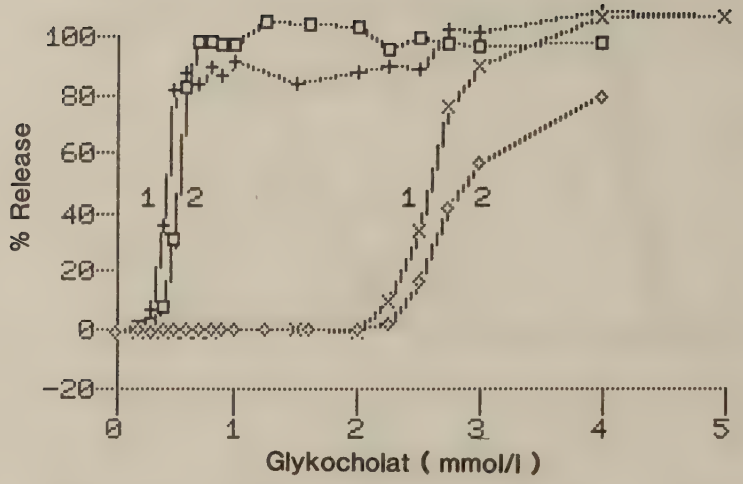


Abbildung 49: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 50ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit GC inkubiert wurden.

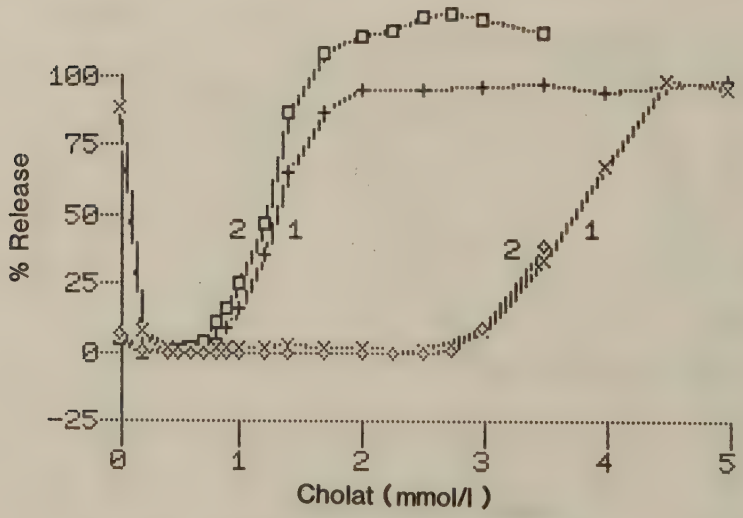


Abbildung 50: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 50ESM-Liposomen, die bei 35 - 40°C mit C inkubiert wurden.

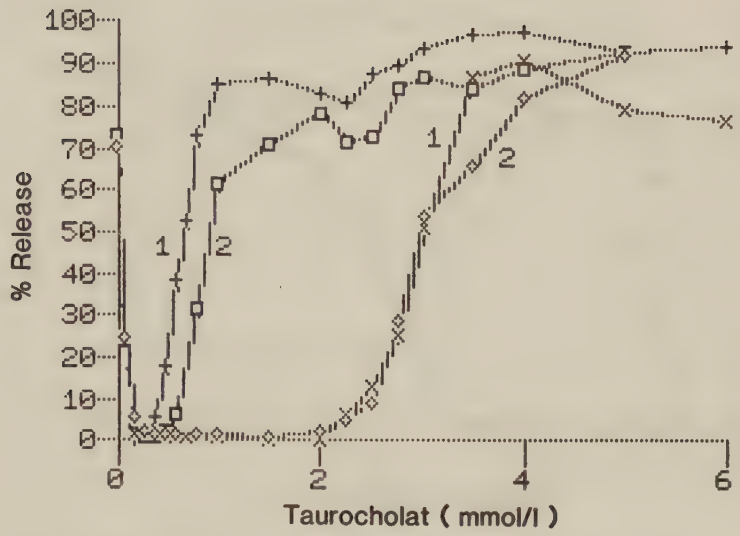


Abbildung 51: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 50ESM-Liposomen, die bei 35 - 40°C mit TC inkubiert wurden.

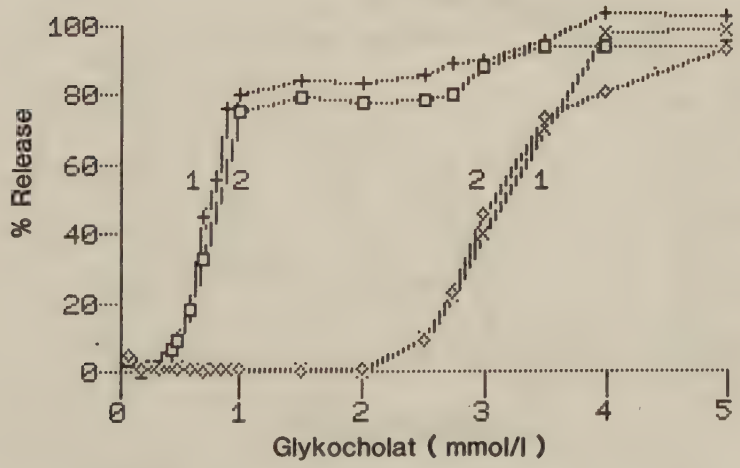


Abbildung 52: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 50ESM-Liposomen, die bei 35 - 40°C mit GC inkubiert wurden.

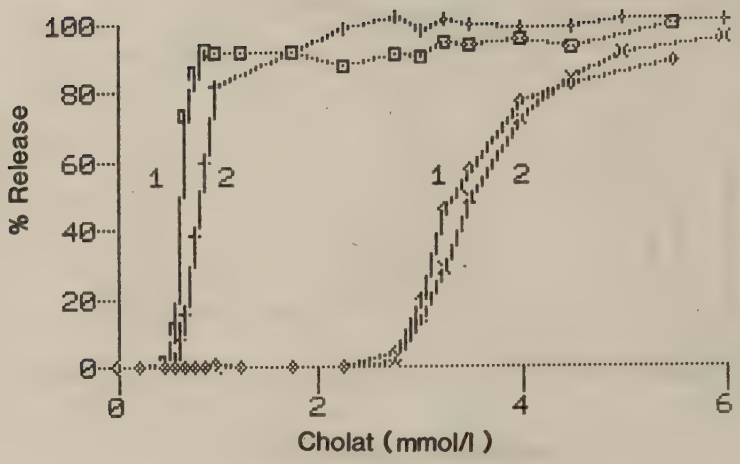


Abbildung 53: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 65ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit C inkubiert wurden.

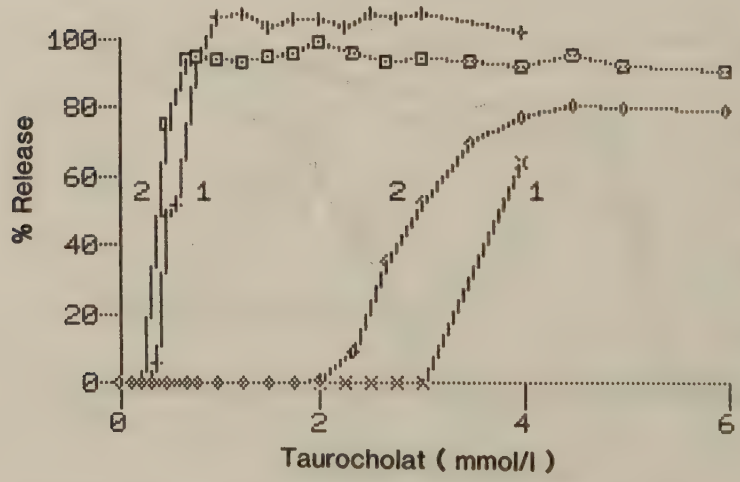


Abbildung 54: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 65ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit TC inkubiert wurden.

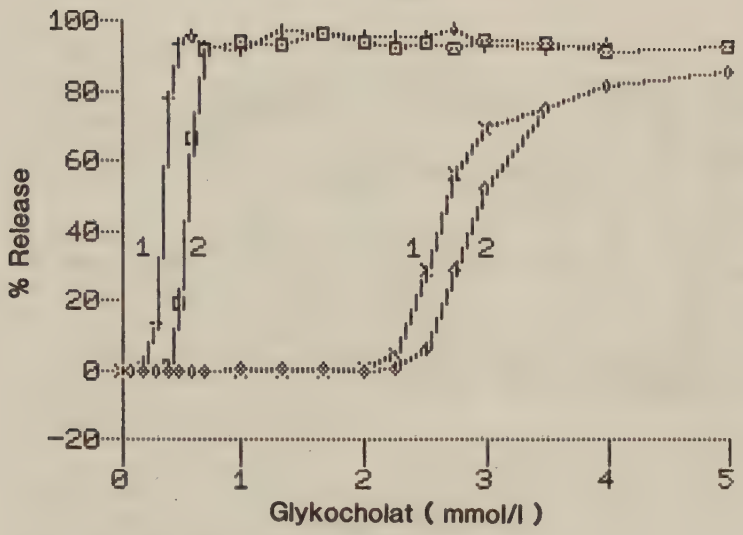


Abbildung 55: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 65ESM-Liposomen, die bei 20 - 25°C mit GC inkubiert wurden.

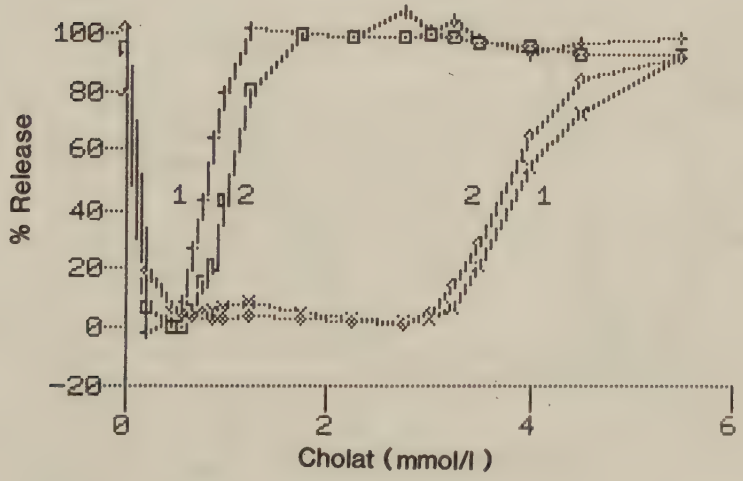


Abbildung 56: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 65ESM-Liposomen, die bei 40 - 45°C mit C inkubiert wurden.

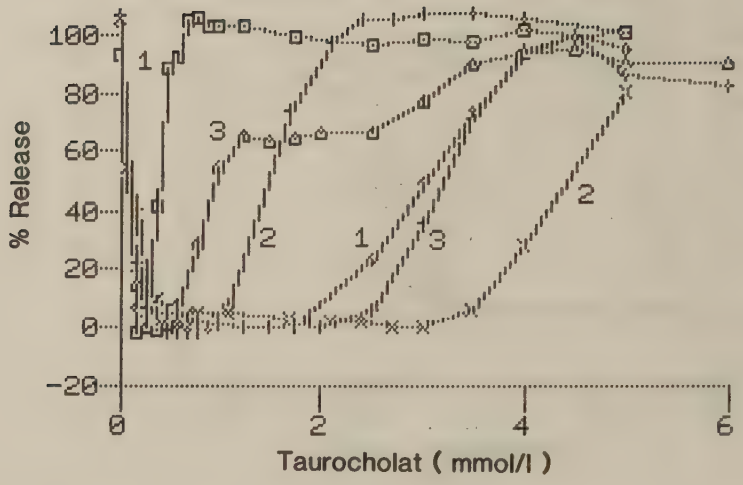


Abbildung 57: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 65ESM-Liposomen, die bei 40 - 45°C mit TC inkubiert wurden.

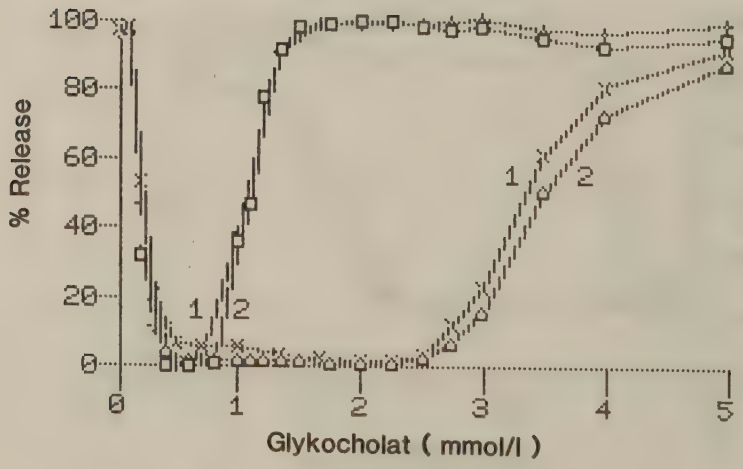


Abbildung 58: Permeabilisierung (linke Kurven) und Solubilisierung (rechte Kurven) von 65ESM-Liposomen, die bei 40 - 45°C mit GC inkubiert wurden.

7. Literaturverzeichnis

1. Barenholz, Y., Suurkuusk, J., Mountcastle, D., Thompson, T.E., Biltonen, R.L. (1976)
A Calorimetric Study of the Thermotropic Behavior of Aqueous Dispersions of Natural and Synthetic Sphingomyelins
Biochemistry 15 (11), 2441-2447

2. Barenholz, Y., Thompson, T.E. (1980)
Sphingomyelins in Bilayers and Biological Membranes
Biochim. Biophys. Acta 604, 129-158

3. Billington, D., Coleman, R. (1978)
Effects of Bile Salts on Human Erythrocytes - Plasma Membrane Vesiculation, Phospholipid Solubilization and their Possible Relationships to Bile Secretion
Biochim. Biophys. Acta 509, 33-47

4. Billington, D., Coleman, R., Lusak, Y.A. (1977)
Topographical Dissection of Sheep Erythrocyte Membrane Phospholipids by Taurocholate and Glycocholate
Biochim. Biophys. Acta 466, 526-530

5. Boegheim Jr., J.P.J., Van Linde, M., Op Den Kamp, J.A.F., Roelofsen, B. (1983)
The Sphingomyelin Pools in the Outer and Inner Layer of The Human Erythrocyte Membrane are Composed of Different Molecular Species
Biochim. Biophys. Acta 735, 438-442

6. Borochov, H., Shinitzky, M., Barenholz, Y. (1979)
Sphingomyelin Phase Transition in the Sheep Erythrocyte Membrane
Cell Biophysics 1, 219-228

7. Borochov, H., Zahler, P., Wilbrandt, W., Shinitzky, M. (1977)
The Effect of Phosphatidylcholine to Sphingomyelin Mole Ratio on the Dynamic Properties of Sheep Erythrocyte Membrane
Biochim. Biophys. Acta 470, 382-388

8. Bourges, M., Small, D.M., Dervichian, D.G. (1967)
Biophysics of Lipid Associations. III. The Quaternary Systems Lecithin-Bile Salt-Cholesterol-Water
Biochim. Biophys. Acta 144, 189-201

9. Calhoun, W.I., Shipley, G.G. (1979)
Sphingomyelin-Lecithin Bilayers and Their Interaction with Cholesterol
Biochemistry 18 (9), 1717-1722

10. Calhoun, W.I., Shipley, G.G. (1979)
Fatty Acid Composition and Thermal Behavior of Natural Sphingomyelins
Biochim. Biophys. Acta 555, 436-441

11. Castellino, F.J. (1978)
31-P NMR Analysis of the Surface Homogeneity of Mixed Sphingomyelin-Phosphatidylcholine Vesicles

Arch. Biochem. Biophys. 189 (2), 465-470

12. Claffey, W.J., Holzbach R.T. (1981)
Dimorphism in Bile Salt / Lecithin Mixed Micelles
Biochemistry 20, 415-418

13. Coleman, R., Holdsworth, G. (1976)
The Release of Membrane Components Prior to Haemolysis during Extraction of Intact Erythrocytes with Bile Salts
Biochim. Biophys. Acta 426, 776-780

14. Coleman, R., Holdsworth, G., Finean, J.B. (1976)
Detergent Extraction of Erythrocyte Ghosts - Comparison of Residues after Cholate and Triton-X-100 Treatments
Biochim. Biophys. Acta 436, 38-44

15. Coleman, R., Iqbal, S., Godfrey, P.P., Billington, D. (1979)
Membranes and Bile Formation
Biochem. J. 178, 201-208

16. Coleman, R., Lowe, P.J., Billington, D. (1980)
Membrane Lipid Composition and Susceptibility to Bile Salt Damage
Biochim. Biophys. Acta 599, 294-300

17. Cullis, P.R., Hope, M.J. (1980)
The Bilayer Stabilizing Role of Sphingomyelin in the Presence of Cholesterol - A 31-P NMR Study
Biochim. Biophys. Acta 597, 533-542

18. Demel, R.A., Jansen, J.W.C.M., Van Dijck, P.W.M., Van Deenen, L.L.M. (1977)
The Preferential Interaction of Cholesterol with Different Classes of Phospholipids
Biochim. Biophys. Acta 465, 1-10

19. Estep, T.N., Calhoun, W.I., Barenholz, Y., Biltonen, R.L., Shipley, G.G., Thompson, T.E. (1980)
Evidence for Metastability in Stearoylsphingomyelin Bilayers
Biochemistry 19 (1), 20-24

20. Estep, T.N., Freire, E., Anthony, F., Barenholz, Y., Biltonen, R.L., Thompson, T.E. (1981)
Thermal Behavior of Stearoylsphingomyelin-Cholesterol Dispersions
Biochemistry 20 (25), 7115-7118

21. Evans, W.H. (1980)
A Biochemical Dissection of the Functional Polarity of the Plasma Membrane of the Hepatocyte
Biochim. Biophys. Acta 604, 27-64

22. Evans, W.H., Kremmer, T., Culvenor, J.G. (1976)
Role of Membranes in Bile Formation - Comparison of the Composition of Bile and a Liver Bile-Canalicular Plasma-Membrane Subfraction
Biochem. J. 154, 589-595

23. Fromherz, P., Röcker, C., Rüppel, D. (1986)
From Discoid Micelles to Spherical Vesicles, the Concept of Edge-Activity
Faraday Discuss. Chem. Soc. 81/3

24. Gershfeld, N.L., Stevens Jr., W.B., Nossal, R.J. (1986)
Equilibrium Studies of a Phospholipid Bilayer Assembly
Coexistence of Surface Bilayers and Unilamellar Vesicles
Faraday Discuss. Chem. Soc. 81/1

25. Hertz, R., Barenholz, Y. (1975)
Permeability and Integrity Properties of Lecithin-Sphingomyelin Liposomes
Chem. Phys. Lipids 15, 138-156

26. Hertz, R., Barenholz, Y. (1977)
The Relations between the Composition of Liposomes and Their Interaction with Triton X-100
Journal of Colloid and Interface Science 60 (1), 188-200

27. Higgins, J.A., Evans, H. (1978)
Transverse Organization of Phospholipids across the Bilayer of Plasma-Membrane Subfractions of Rat Hepatocytes
Biochem. J. 174, 563-567

28. Inoue, K., Kitagawa, T. (1974)
Effect of Exogenous Lysolecithin on Liposomal Membranes
Its Relation to Membrane Fluidity
Biochim. Biophys. Acta 363, 361-372

29. Inoue, K., Kitagawa, T. (1976)
Effect of Lipid Composition on Sensitivity of Lipid Membranes to Triton X-100
Biochim. Biophys. Acta 426, 1-16

30. Khare, R.S., Worthington, C.R. (1978)
The Structure of Oriented Sphingomyelin in Bilayers
Biochim. Biophys. Acta 514, 239-254

31. Kinsky, S.C., Haxby, J.A., Zopf, D.A., Alving, C.R., Kinsky, C.B.
Complement-Dependent Damage to Liposomes Prepared from Pure Lipids and Forssman Hapten
Biochemistry 8 (10), 4149-4158

32. Kirkpatrick, F.H., Gordesky, S.E., Marinetti, G.V. (1974)
Differential Solubilization of Proteins, Phospholipids and Cholesterol of Erythrocyte Membranes by Detergents
Biochim. Biophys. Acta 345, 154-161

33. Kremmer, T., Wisher, M.H., Evans, W.H. (1976)
The Lipid Composition of Plasma Membrane Subfractions Originating from the three Major Functional Domains of the Rat Hepatocyte Cell Surface
Biochim. Biophys. Acta 455, 655-664

34. Lentz, B.R., Hoechli, M., Barenholz, Y. (1981)

Acyl Chain Order and Lateral Domain Formation in Mixed Phosphatidylcholine-Sphingomyelin Multilamellar and Unilamellar Vesicles
Biochemistry 20 (24), 6803-6809

35. Mazer, N.A., Kwasnick, R.F., Carey, M.C., Benedek, G.B. (1976)
Quasielastic Light Scattering Spectroscopic Studies of Aqueous Bile Salt, Bile Salt-Lecithin and Bile Salt-Lecithin-Cholesterol Solutions
Micellization, Solubilization, Microemulsions 1, 383-402

36. Meier, P.J., Sztul, E.S., Reuben, A., Boyer, J.L. (1984)
Structural and Functional Polarity of Canalicular and Basolateral Plasma Membrane Vesicles Isolated in High Yield from Rat Liver
J. Cell Biol. 98, 991-1000

37. Merajver, S.D., Sheridan, J.P. (1981)
Theory of the Conformational Order of Single Component Sphingomyelin Bilayers
J. theor. Biol. 93, 737-755

38. Milsmann, M.H.W., Schwendener, R.A., Weder, H.-G. (1978)
The Preparation of Large Single Bilayer Liposomes by a Fast and Controlled Dialysis
Biochim. Biophys. Acta 512, 147-155

39. Müller, K. (1981)
Structural Dimorphism of Bile Salt/Lecithin Mixed Micelles. A Possible Regulatory Mechanism for Cholesterol Solubility in Bile? X-Ray Structure Analysis
Biochemistry 20, 404-414

40. Nakayama, F., Blomstrand, R. (1961)
Neutron Activation Paper Chromatographic Analysis of Phospholipids in Human Liver and Bile
Acta Chemica Scand. 15, 1595-1603

41. Neuringer, L.J., Sears, B., Jungalwala, F.B., Shriver, E.K. (1979)
Differnce in Orientational Order in Phospholipid and Sphingomyelin Bilayers
FEBS Lett. 104 (1), 173-175

42. O'Brien, J.S. (1967)
Cell Membranes - Composition:Structure:Function
J. theor. Biol. 15, 307-324

43. Oldfield, E., Chapman, D. (1972)
Molecular Dynamics of Cerebroside-Cholesterol and Sphingomyelin-Cholesterol Interactions: Implications for Myelin Membrane Structure
FEBS Lett. 21 (3), 303-306

44. Patton, S. (1970)
Correlative Relationship of Cholesterol and Sphingomyelin in Cell Membranes
J. theor. Biol. 29, 489-491

45. Raper, J.H., Gammack, D.B., Sloane-Stanley, G.H. (1966)
A Study of Cerebral Sphingomyelins in Monomolecular Films
Biochem. J. 98, 21p

46. Reiss-Husson, F. (1967)
Structure des Phases Liquides-Cristallines de Differents Phospholipides, Monoglycerides, Sphingolipides, Anhydres ou en Presence d'Eau
J. Mol. Biol. 25, 363-382

47. Renooij, W., Van Golde, L.M.G., Zwaal, R.F.A., Van Deenen, L.L.M. (1976)
Topological Asymmetry of Phospholipid Metabolism in Rat Erythrocyte Membranes - Evidence for Flip-Flop of Lecithin
Eur. J. Biochem. 61, 53-58

48. Sackmann, E. (1984)
Physical Basis of Trigger Processes and Membrane Structure, 106-143
in : Biological Membranes Vol. 5; Academic Press Inc., London

49. Schmidt, C.F., Barenholz, Y., Huang, C., Thompson, T.E. (1978)
Monolayer Coupling in Sphingomyelin Bilayer Systems
Nature 271, 775-777

50. Schmidt, C.F., Barenholz, Y., Thompson, T.E. (1977)
A Nuclear Magnetic Resonance Study of Sphingomyelin in Bilayer Systems
Biochemistry 16 (12), 2649-2656

51. Schubert, R., Beyer, K., Wolburg, H., Schmidt, K.H. (1986)
Structural Changes in Membranes of Large Unilamellar Vesicles after Binding of Sodium Cholate
Biochemsitry, Publikation in Vorbereitung

52. Schubert, R., Jaroni, H.W., Schmidt, K.H. (1985)
Lipid Composition Influences Membrane Permeabilization and Solubilization of Large unilamellar Vesicles by Different Bile Salts
Annual Meating of the Contact Group on "Model Membranes", Kortrijk 27.9.85

53. Schubert, R., Jaroni, H., Schoelmerich, J., Schmidt, K.H. (1983)
Studies on the Mechanism of Bile Salt-Induced Liposomal Membrane Damage
Digestion 28, 181-190

54. Seelig, J. (1978)
31-P Nuclear Magnetic Resonance and the Head Group Structure of Phospholipids in Membranes
Biochim. Biophys. Acta 515, 105-140

55. Shinitzky, M., Barenholz, Y. (1974)
Dynamics of the Hydrocarbon Layer in Liposomes of Lecithin and Sphingomyelin Containing Dicetylpohosphate

J. Biol. Chem. 249 (8), 2652-2657

56. Shipley, G.G., Avecilla, L.S., Small, D.M. (1974)
Phase Behavior and Structure of Aqueous Dispersions of Sphingomyelin
J. Lipid Res. 15, 124-131

57. Small, D.M. (1971)
The Physical Chemistry of Cholanic Acids, 249-355
in: Nair, P.P., Kritchevsky, D.: The Bile Acids, Volume I: Chemistry; Plenum Press, New York - London

58. Small, D.M., Penkett, S.A., Chapman, D. (1969)
Studies on Simple and Mixed Bile Salt Micelles by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
Biochim. Biophys. Acta 176, 178-189

59. Spitzer, H.L., Kyriakides, E.C., Balint, J.A. (1964)
Biliary Phospholipids in Various Species
Nature 204, 288

60. Stubbs, C.D. (1983)
Membrane Fluidity: Structure and Dynamics of Membrane Lipids, 1-39
in: Essays in Biochemistry; Vol. 19, The Biochemical Society

61. Suurkuusk, J., Lentz, B.R., Barenholz, Y., Biltonen, R.L., Thompson, T.E. (1976)
A Calorimetric and Fluorescent Probe Study of the Gel-Liquid Crystalline Phase Transition in Small, Single-Lamellar Dipalmitoylphosphatidylcholine Vesicles
Biochemistry 15 (7), 1393-1401

62. Tirri, L.J., Ayengar, N.K.N., Lipton, L.C., Chatterjie, N., Brockerhoff, H. (1978)
Studies on the Hydrogen Belts of Membranes: III. Glycerol Permeability of Dihydrosphingomyelin-Cholesterol Membranes
Lipids 13, 267-269

63. Ulmius, J., Lindblom, G., Wennerström, H., Johansson, L.B.-A., Fontell, K., Söderman, O., Arvidson, G. (1982)
Molecular Organization in the Liquid-Crystalline Phases of Lecithin-Sodium Cholate-Water Systems Studied by Nuclear Magnetic Resonance
Biochemistry 21, 1553-1560

64. Untracht, S.H., Shipley, G.G. (1977)
Molecular Interactions between Lecithin and Sphingomyelin - Temperature- and Composition-Dependent Phase Separation
J. Biol. Chem. 252, 4449-4457

65. Verkleij, A.J. (1984)
Lipidic Intramembranous Particles
Biochim. Biophys. Acta 779, 43-63

66. Verkleij, A.J., Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., Van Deenen, L.L.M. (1973)
The Asymmetric Distribution of Phospholipids in the Human Red Cell Membrane - A Combined Study Using Phospholipases and Freeze-Etch Electron Microscopy
Biochim. Biophys. Acta 323, 178-193

67. Vyvoda, O.S., Coleman, R., Holdsworth, G. (1977)
Effects of Different Bile Salts upon the Composition and Morphology of a Liver Plasma Membrane Preparation - Deoxycholate is more Membrane Damaging than Cholate and its Conjugates
Biochim. Biophys. Acta 465, 68-76

68. Weltzien, H.U., Arnold, B., Reuther, R. (1977)
Quantitative Studies on Lysolecithin-Mediated Hemolysis
Use of Ether-Deoxy Lysolecithin Analogs with Varying Aliphatic Chain-Lengths
Biochim. Biophys. Acta 466, 411-421

69. Wissenschaftliche Tabellen Geigy
8. Auflage, Kapitel Körperflüssigkeiten - Galle

70. Wu, S.H.-W., McConnell, H.M. (1975)
Phase Separations in Phospholipid Membranes
Biochemistry 14 (4), 847-854

71. Yeagle, P.L., Hutton, W.L., Martin, R.B.
Sphingomyelin Multiple Phase Behavior as Revealed by Multinuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
Biochemistry 17, 5745-5750

72. Yousef, I.M., Bloxam, D.L., Phillips, M.J., Fisher, M.M. (1975)
Liver Cell Plasma Membrane Lipids and the Origin of Biliary Phospholipid
Can. J. Biochem. 53, 989-997

73. Yousef, I.M., Fisher, M.M. (1976)
In Vitro Effect of Free Bile Acids on the Bile Canalicular Membrane Phospholipids in the Rat
Can. J. Biochem. 54, 1040-1046

Peter Bernhard Troschel - Lebenslauf

1958	geboren am 4. Juli 1958 in Kronach als erster Sohn von Herbert und Anneliese Troschel
1977	Abitur am Wieland-Gymnasium Biberach
1977 - 1978	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz Biberach
1978 - 1980	Vorklinische Ausbildung an der Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Universität Ulm
1980 - 1984	Klinische Ausbildung an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1984 - 1985	Praktisches Jahr an Lehrkrankenhäusern der Université II de Bordeaux
1985	am 15. November Ablegen der Ärztlichen Prüfung in Tübingen

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45